

# 酸化および窒素化ストレス状態を評価するバイオマーカーに関する研究

著者	岩崎 雄介
学位名	博士（薬学）
学位授与機関	星薬科大学
学位授与年度	2011年度
学位授与番号	32676乙第193号
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1240/00000347/">http://id.nii.ac.jp/1240/00000347/</a>

酸化および窒素化ストレス状態を評価する  
バイオマーカーに関する研究

Study of biomarker for assessment of  
oxidative and nitrosative stress

岩崎 雄介

## 目次

緒論	・ ・ 1
第 1 章 酸化および窒素化ストレス状態を評価する生体内バイオマーカーの 分析法の開発	・ ・ 3
第 1-1 節 序論	
第 1-2 節 スピントラッピング剤に POBN を用いた電子スピン共鳴法による ヒドロキシルラジカル測定法の開発	
第 1-3 節 高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光光度検出/電気化学検出を 用いた dG および 8-OHdG の測定	
第 1-4 節 液体クロマトグラフィー/蛍光検出によるチロシン類縁化合物の測定	
第 1-4-1 項 各種蛍光誘導体化の比較検討	
第 1-4-2 項 LC 測定条件の最適化	
第 1-4-3 項 固相抽出法による前処理方法の検討	
第 1-4-4 項 分析法バリデーション	
第 1-4-5 項 活性酸素種および活性窒素種がチロシン類縁化合物の 酸化および窒素化に与える影響	
第 1-5 節 カラムスイッチング-親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法に よる生体試料中のチオール化合物分析法の構築	
第 1-5-1 項 自動酸化を防ぐための誘導体化試薬の検討	
第 1-5-2 項 2 段階誘導体化条件の最適化	
第 1-5-3 項 HILIC による分離条件の検討およびカラムスイッチング法を用いた 試料前処理操作の自動化	
第 1-5-4 項 分析法バリデーション	
第 1-5-5 項 酸化および窒素化ストレス評価への応用	
第 1-6 節 小括	
第 2 章 食品中の化学物質の複合反応による活性酸素種および活性窒素種の生成	・ ・ 42
第 2-1 節 序論	

第 2-2 節	フェノール性化合物と金属の併用が活性酸素種生成に及ぼす影響	
第 2-2-1 項	吸光光度法による Antioxidant 作用の評価	
第 2-2-2 項	電子スピン共鳴法による Prooxidant 作用の評価	
第 2-2-3 項	DNA 損傷の評価のための 8-OHdG の測定	
第 2-3 節	フェノール性化合物と亜硝酸ナトリウムの併用が活性酸素種および 活性窒素種の生成に及ぼす影響	
第 2-3-1 項	ニトロ化合物の合成	
第 2-3-2 項	<i>in vitro</i> における試薬の安定性評価	
第 2-3-3 項	吸光光度法による Antioxidant 作用の評価	
第 2-3-4 項	電子スピン共鳴法および高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光光度 検出/電気化学検出による Prooxidant 作用の評価	
第 2-3-5 項	Griess 法による活性窒素種の測定	
第 2-4 節	小括	
第 3 章	酸化および窒素化ストレス評価のための唾液中グルタチオンの測定	・ ・ 64
第 3-1 節	序論	
第 3-2 節	親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法による 唾液中グルタチオン分析法の構築	
第 3-2-1 項	分離条件の検討	
第 3-2-2 項	還元型グルタチオンの誘導体化	
第 3-2-3 項	MS 測定条件の最適化	
第 3-2-4 項	固相抽出法による試料前処理	
第 3-2-5 項	分析法バリデーション	
第 3-3 節	生体試料への応用および血液と唾液の相関性	
第 3-4 節	小括	
総括		・ ・ 77
謝辞		・ ・ 79
実験の部		・ ・ 80
参考文献		・ ・ 92

## 論文リスト

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基本とするものである。

- 1) **Y. Iwasaki**, T. Hirasawa, Y. Maruyama, Y. Ishii, R. Ito, K. Saito, T. Umemura, A. Nishikawa, H. Nakazawa, Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. *Toxicol. in Vitro*, 25(7), 1320-1327 (2011).

(第 1 章および第 2 章)

- 2) **Y. Iwasaki**, K. Mochizuki, Y. Nakano, N. Maruya, M. Goto, Y. Maruyama, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Comparison of fluorescence reagents for simultaneous determination of hydroxylated phenylalanine and nitrated tyrosine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.*, 26(1), 41-50 (2012).

(第 1 章)

- 3) **Y. Iwasaki**, Y. Nakano, K. Mochizuki, T. Ogawa, M. Oda, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Quantification of reduced and oxidized thiols in mouse serum by column-switching hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 56(1), 103-113 (2011).

(第 1 章)

- 4) **Y. Iwasaki**, M. Nomoto, M. Oda, K. Mochizuki, Y. Nakano, Y. Ishii, R. Ito, K. Saito, T. Umemura, A. Nishikawa, H. Nakazawa, Characterization of nitrated phenolic compounds for their anti-oxidant, pro-oxidant, and nitration activities. *Arch. Biochem. Biophys.*, 513(1) 10-18 (2011).

(第 2 章)

- 5) **Y. Iwasaki**, M. Hoshi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Analysis of glutathione and glutathione disulfide in human saliva using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 839(1-2), 74-79 (2006).

(第 1 章および第 3 章)

## 略語リスト

APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
C	Catechin
CaA	Caffeic acid
CG	Catechin gallate
$\cdot\text{CH}_3$	Methyl radical
ChA	Chlorogenic acid
Cys	Cystein
CysSS	Cystine
DBD-F	4-( <i>N,N</i> -Dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole
dG	Deoxyguanosine
DMEQ-COCl	3-Chlorocarbonyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2( <i>IH</i> )-quinoxalinone
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
EC	Epicatechin
ECD	Electrochemical detector
ECG	Epicatechin gallate
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin gallate
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESI	Electrospray ionization
ESR	Electron spin resonance spectroscopy
FA	Ferulic acid
FITC-I	Fluorescein-4-isothiocyanate
FL	Fluorescence detector
Fmoc-Cl	9-Fluorenylmethyl chloroformate
GC	Gallocatechin

GCG	Gallocatechin gallate
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
Hcy	Homocysteine
HcySS	Homocystine
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography
HLB	Hydrophilic lipophilic balanced
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LC	Liquid chromatography
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LPS	Lipopolysaccharide
MAX	Mixed mode anion exchange
MCX	Mixed mode cation exchange
MDL	Method detection limit
MQL	Method quantification limit
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
NaNO <sub>2</sub>	Sodium nitrite
NBD-F	4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole
NBenzM	<i>N</i> -Benzylmaleimide
NCycloM	<i>N</i> -Cyclohexylmaleimide
NDA	2,3-Naphthalenedialdehyde
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleimide
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
4-NP	4-Nitrophenylalanine
3-NT	3-Nitro-L-tyrosine
•OH	Hydroxyl radical
8-OHdG	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine

OPA	<i>o</i> -Phthalaldehyde
PBS	Phosphate buffered saline
Phe	Phenylalanine
POBN	$\alpha$ -(4-Pyridyl-1-oxide)- <i>N</i> - <i>tert</i> -butylnitrone
QA	Quinic acid
QC	Quality control
Que	Quercetin
Res	Resveratrol
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RPC	Reversed phase chromatography
Rut	Rutin
TNF	Tumor necrosis factor
<i>m</i> -Tyr	<i>m</i> -Tyrosine
<i>o</i> -Tyr	<i>o</i> -Tyrosine
<i>p</i> -Tyr	<i>p</i> -Tyrosine
UV	Ultraviolet detector



## 緒論

生体中に存在する酸化物質と抗酸化物質の活性は、生体の恒常性維持のために、一定のバランスが保たれている。しかし、酸化物質と抗酸化物質のバランスが崩れ、酸化物質が過剰な酸化ストレス状態<sup>1)</sup>になると、動脈硬化<sup>2)</sup>や発がん<sup>3,4)</sup>、生活習慣病<sup>5,6)</sup>など、さまざまな病態を引き起こす。同様に、窒素化物質が過剰に存在すると、窒素化ストレス状態を引き起こし、発がんなどを惹起する<sup>7,8)</sup>。そのため、生体内の酸化および窒素化ストレス状態を正確に把握することは、健康状態の評価に有用であると考えられる。

一方、生体内には核酸、タンパク質、脂質など多くの機能性高分子が存在し、その種類・役割は多種多様である。これらの化合物のほとんどは酵素などによって生体内で作り出される化合物であり、生体を構成するのに重要な物質である。核酸を構成する含窒素塩基はアデニン、グアニンといったプリン塩基と、シトシン、チミンといったピリミジン塩基の誘導体がある。また、RNA から合成される各種タンパク質およびアミノ酸は、生体内構成成分としてさまざまな役割を果たしている。酸化および窒素化ストレス状態になると、活性酸素種 (ROS) および活性窒素種 (RNS) など、さまざまな活性種が生体内で産生され、DNA やタンパク質などの構成成分の酸化および窒素化修飾などが引き起こされる<sup>9,10)</sup>。酸化および窒素化修飾を受けた生体成分は、ROS および RNS の痕跡を残す特異的な現象を惹起し、酸化および窒素化ストレスマーカーとして生体内から検出される<sup>11,12)</sup>。そのため、酸化および窒素化ストレスマーカーを測定することは酸化および窒素化ストレスの関与を検討する上で最も重要な手掛かりとなる。

酸化および窒素化ストレスは、それぞれ前述のように ROS および RNS によって惹起され、生体成分に影響を与えることでさまざまな疾病を引き起こすことから、これら进行评估できるバイオマーカーについての研究が数多く報告されるようになった<sup>13-16)</sup>。しかし、酸化および窒素化ストレスによって生成される化合物が多種にわたるため、ROS および RNS を評価できる有用なバイオマーカーは確立されていない。

本研究では、生活習慣が酸化および窒素化ストレス産生に及ぼす影響を評価するために、酸化物質と抗酸化物質に着目し、*in vitro*、*in vivo* で酸化および窒素化ストレス状態の評価が可能な高感度・選択的な生体内バイオマーカー分析法の構築を行った。

第1章では、酸化および窒素化ストレス状態を評価する基礎研究として、酸化物質である ROS の代表物質としてヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) の測定、ROS によって影響を受け

る生体成分である DNA およびアミノ酸の類縁化合物を、更に、抗酸化物質のチオール化合物を測定対象とした分析法の開発をそれぞれ検討した。

第 2 章では、生活習慣が ROS および RNS の生成に関わる要因として、食品中の化学物質の複合反応に着目し、第 1 章で構築した分析法を用いて *in vitro* で ROS および RNS の産生量について評価した。

第 3 章では、酸化および窒素化ストレスを評価する簡便なスクリーニングを行うために血液に代わる新たな臨床検体材料であり、非侵襲的に採取が可能である唾液試料の分析法を検討し、第 1 章で有用性が確認された還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオン (GSSG) の測定を試みた。

## 第 1 章 酸化および窒素化ストレス状態を評価する

### 生体内バイオマーカーの分析法の開発

#### 第 1-1 節 序論

生体中には酸化物質と抗酸化物質が存在しており、それぞれの活性は、生体の恒常性維持のために、一定のバランスが保たれている<sup>1)</sup>。そのため、ミトコンドリア内で産生される少量の ROS は抗酸化物質によって直ちに無毒化される。しかし、酸化物質と抗酸化物質のバランスが崩れ、酸化物質が過剰な酸化ストレス状態になると、産生された過剰な ROS を除去することができず、発がんや生活習慣病など、さまざまな病態を引き起こすことが報告されている<sup>2-6)</sup>。同様に、窒素化物質が過剰に存在することは、窒素化ストレス状態を引き起こし、発がんなどを惹起する<sup>7,8)</sup>。

生体内には核酸、タンパク質、脂質など多くの機能性高分子が存在し、生体内で産生される ROS および RNS などによって、酸化および窒素化修飾を受け易くなる<sup>9,10)</sup>。すなわち、酸化および窒素化修飾を受けた生体成分は、ROS および RNS のカスケードとして痕跡を残していくので、生体内から検出されるこれらの物質を酸化および窒素化ストレスマーカーとして測定することは、酸化および窒素化ストレスの関与を検討する上で最も重要な手掛かりとなり、更には健康状態の評価に有用であると考えられる<sup>11,12)</sup>。

酸化および窒素化ストレスは、それぞれ ROS および RNS によって惹起され、生体成分に影響を与えることでさまざまな疾病を引き起こすことから、これら进行评估できるバイオマーカーについての研究が数多く報告されてきた<sup>13-16)</sup>。しかし、酸化および窒素化ストレスによって生成される化合物が多種にわたるため、ROS および RNS を評価できる有用なバイオマーカーは確立されていない。

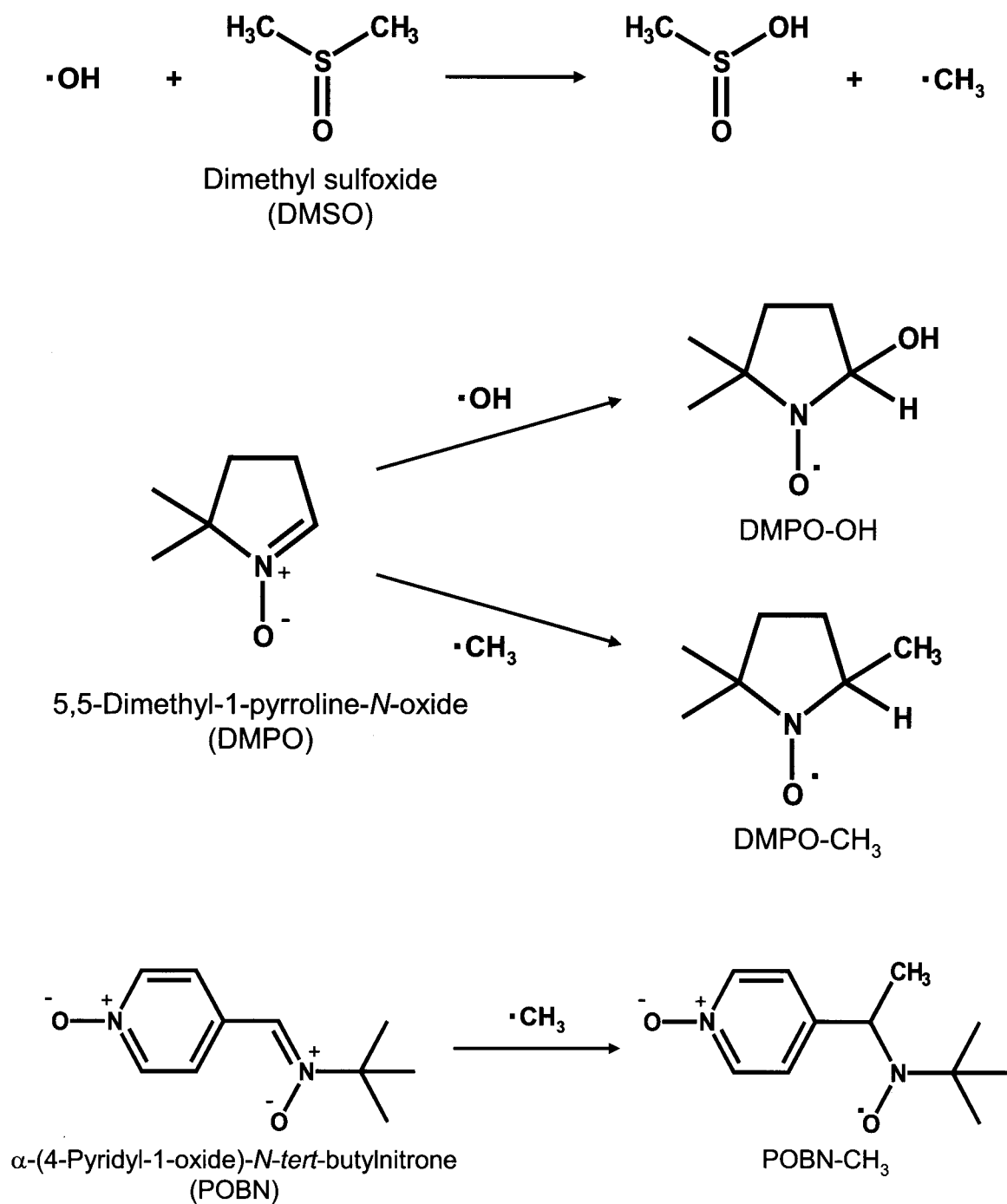
本研究では、酸化物質である ROS の代表物質として $\cdot\text{OH}$ 、更に、ROS および RNS によって影響を受ける生体成分である DNA およびアミノ酸を、また、生体内抗酸化物質として反応性の高いチオール化合物を測定対象とした分析法の開発をそれぞれ試みた。

## 第 1-2 節 スピントラッピング剤に POBN を用いた電子スピン共鳴法による ヒドロキシルラジカル測定法の開発

ROS の生成を評価する方法として、現在までにさまざまな方法が報告されている<sup>17,18)</sup>。その中でも電子スピン共鳴装置を用いた方法 (ESR) はラジカルを直接測定できることから、信頼性の高い方法と考えられる。そこで、汎用性の高いスピントラッピング剤である 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) を用い、 $\cdot\text{OH}$  を測定した。Dimethyl sulfoxide (DMSO) が存在する反応系に  $\cdot\text{OH}$  が発生していた場合、Scheme 1 に示す通り、メチルラジカル ( $\cdot\text{CH}_3$ ) が発生する。Figure 1 に示すように DMPO-OH アダクトでは、超微細結合定数  $\alpha^{\text{N}}=\alpha^{\text{H}}=1.49\text{ mT}$  の 4 本線の ESR スペクトルが観測される。また、DMPO- $\text{CH}_3$  アダクトでは、超微細結合定数  $\alpha^{\text{N}}=1.59\text{ mT}$ 、 $\alpha^{\text{H}}=2.16\text{ mT}$  の 6 本線の ESR スペクトルが観測される<sup>19)</sup>。超微細結合定数は、ESR で測定できるパラメーターの一つであり、超微細構造によって分かれた分裂幅を示す定数である (Table 1)。

ESR による測定の結果、Figure 2 に示すとおり、DMPO に銅イオンを添加することで、 $\cdot\text{OH}$  の生成が認められたが、DMSO を併用した場合、DMSO 由来の  $\cdot\text{CH}_3$  の生成を確認することができなかった。すなわち、DMPO は銅イオンと反応することで、 $\cdot\text{OH}$  に類似したスペクトルを描写するため、 $\cdot\text{OH}$  生成量の評価が困難であることが分かった。

そこで、スピントラッピング剤に  $\alpha$ -(4-Pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitrone (POBN) を用いた方法を検討した。この方法は Scheme 1 で示した通り、発生した  $\cdot\text{OH}$  が DMSO と反応することで生成する  $\cdot\text{CH}_3$  を POBN で補足し、測定する方法である。この POBN- $\text{CH}_3$  アダクトでは、超微細結合定数  $\alpha^{\text{N}}=1.59\text{ mT}$ 、 $\alpha^{\text{H}}=0.28\text{ mT}$  の 6 本線の ESR スペクトルが観測される<sup>20)</sup>。既存の方法である DMPO-OH アダクトと POBN- $\text{CH}_3$  アダクトのシグナル強度比を比較したところ、ともに  $\cdot\text{OH}$  の発生量に比例してシグナルが増加し、シグナル強度比に相関性が認められた。これらの結果から、本法は、銅イオンの影響を受けない、DMPO に代わる  $\cdot\text{OH}$  の測定法として活用できることが判明した (Figure 3)。



Scheme 1 Reaction overviews of DMPO-OH, DMPO-CH<sub>3</sub> and POBN-CH<sub>3</sub>

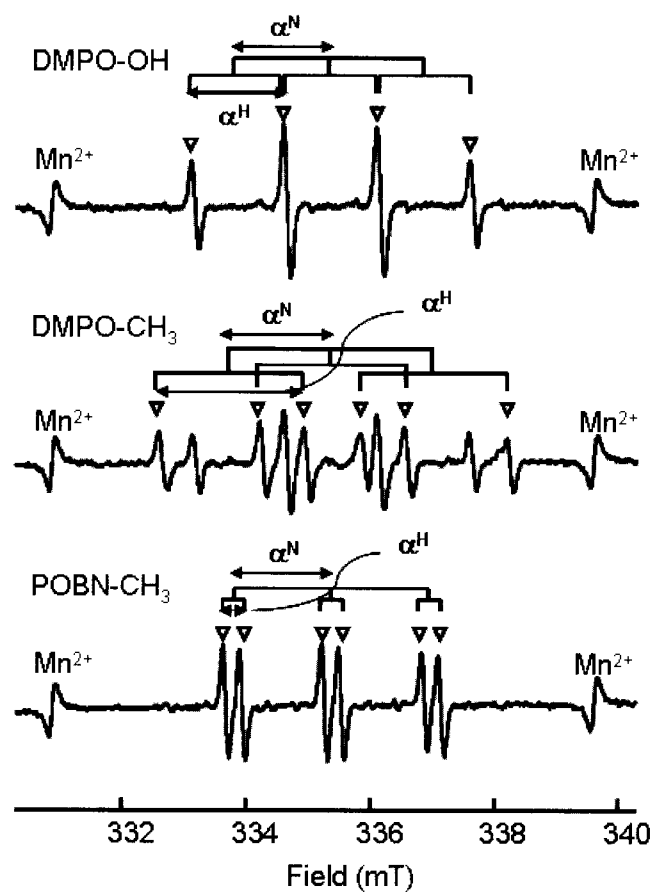


Figure 1 ESR spectra of DMPO-OH, DMPO-CH<sub>3</sub> and POBN-CH<sub>3</sub>

Table 1 Hyperfine coupling constants of spin adducts

Adduct	$\alpha^N$	$\alpha^H$
DMPO-OH	1.49	1.49
DMPO-CH <sub>3</sub>	1.59	2.16
POBN-CH <sub>3</sub>	1.59	0.28

(mT)

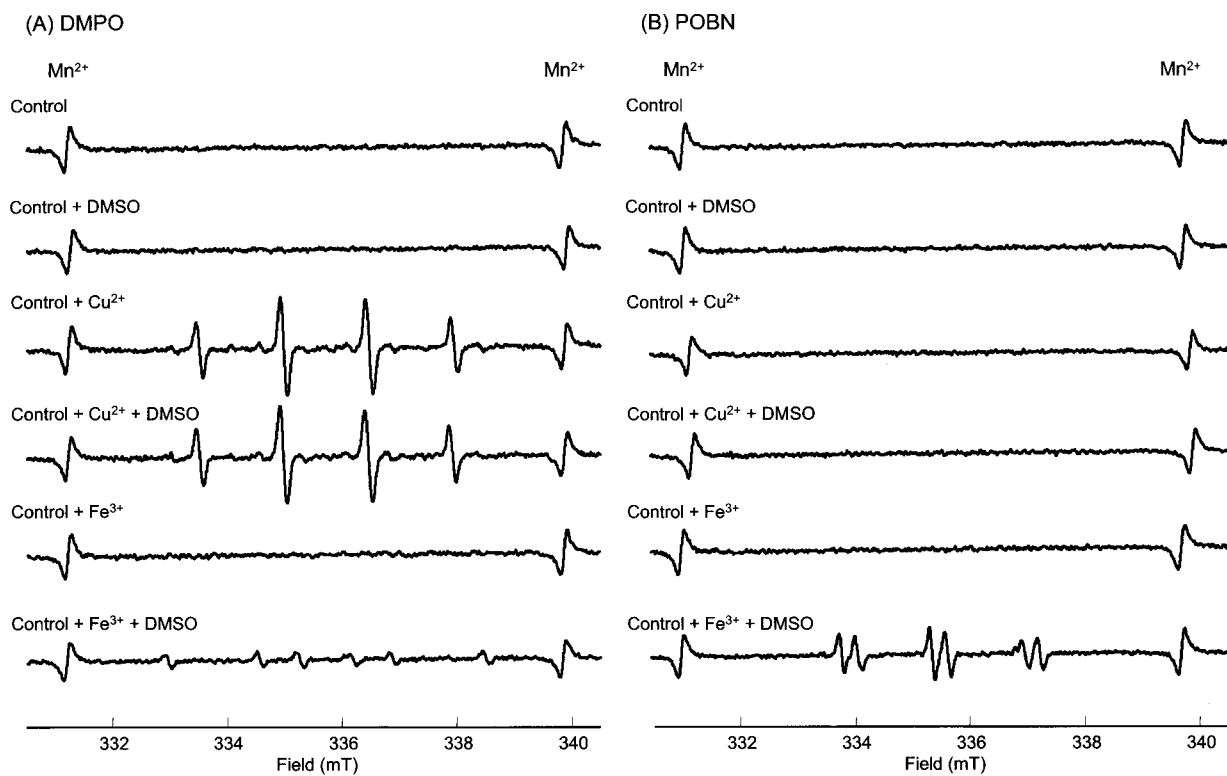


Figure 2 ESR spectra from the reaction of spin trapping reagent with DMSO in presence of a metal ion

(A) DMPO and (B) POBN.

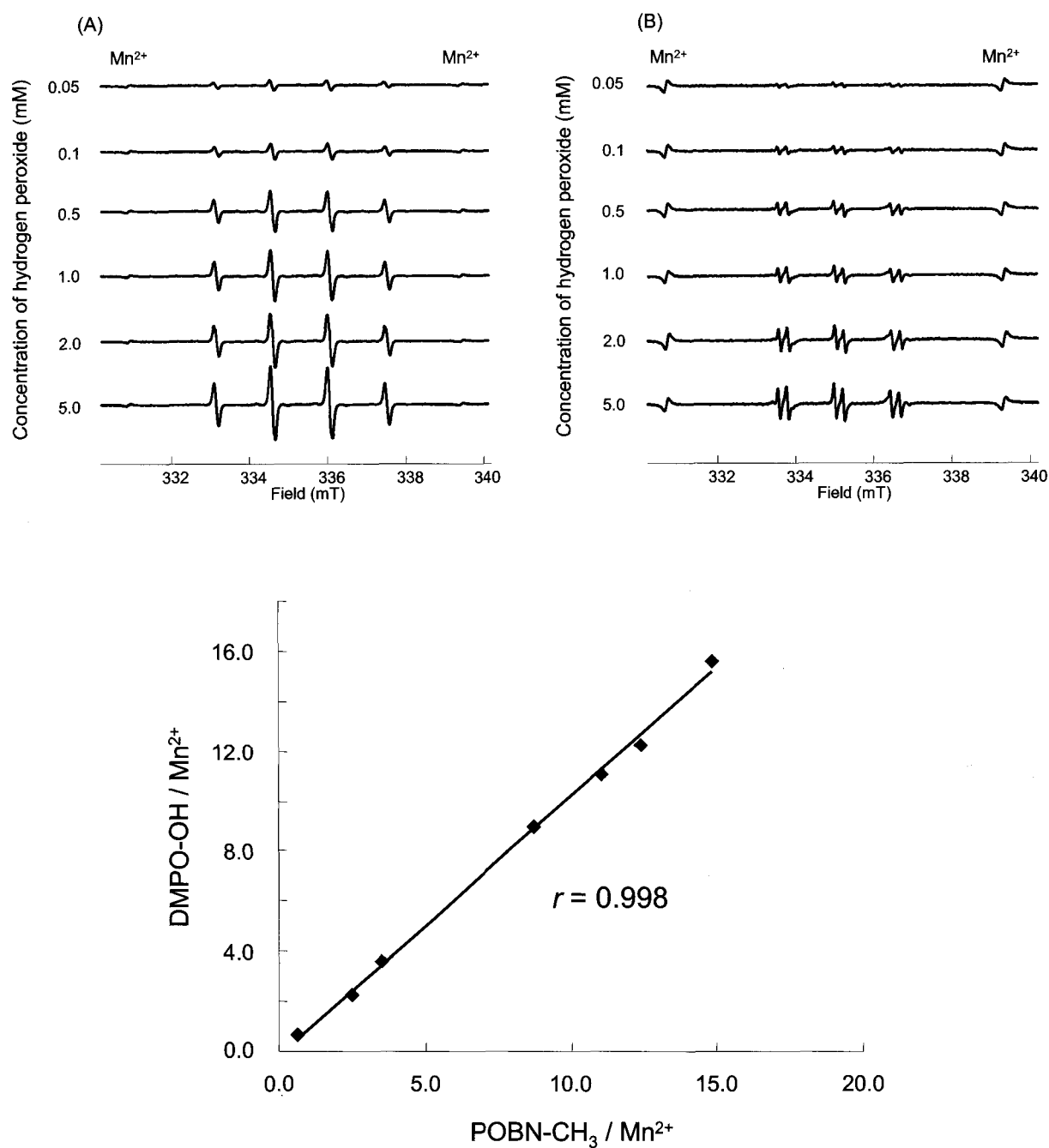


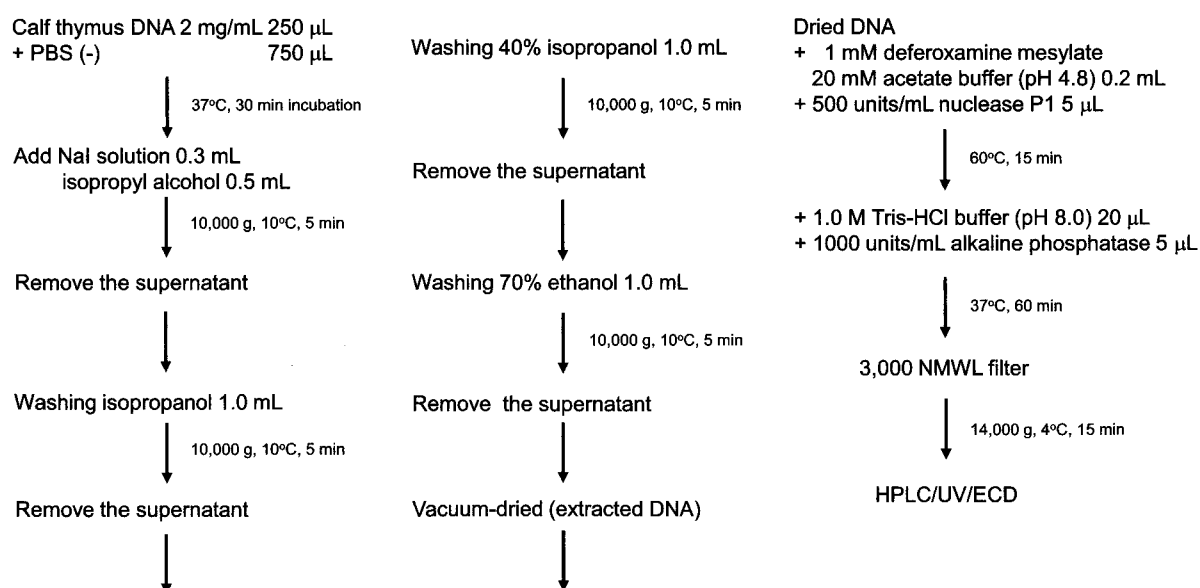
Figure 3 Comparison of ESR spectra between (A) DMPO-OH and (B) POBN-CH<sub>3</sub> (upper)  
Correlation of DMPO-OH and POBN-CH<sub>3</sub> signal (bottom).



### 第 1-3 節 高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光光度検出/電気化学検出を用いた dG および 8-OHdG の測定

ROS による酸化ストレスの増大は核酸の酸化障害を惹起することから、老化や各種疾患との関連が示唆されている。デオキシグアノシン (dG) は DNA の 4 種類の塩基のうち最も酸化還元電位が低いため、ROS による酸化を受けやすいことが知られている。8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) は ROS により dG の 8 位が酸化されて生じる酸化物であり、酸化ストレスの評価として、有用なバイオマーカーである。

生体への影響を検討するため、高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光光度検出/電気化学検出 (HPLC/UV/ECD) を用いた DNA 酸化的損傷の評価法の構築を行った。DNA の抽出・前処理操作は Ishii ら<sup>21)</sup>の方法を参考にして検討した (Scheme 2)。第 1-2 節の Figure 2 で示した通り、溶液中に鉄が存在することで、微量の $\cdot\text{OH}$ が産生されることが明らかとなっている。産生した $\cdot\text{OH}$ は dG と反応することで 8-OHdG に変化するため、測定値に影響を与えることが考えられた。そこで、本実験系では試料溶液中に微量に含まれる鉄を除去する目的で、酢酸緩衝液 (pH 4.8) に鉄のキレート剤であるデフェロキサミンを加えることとした。その結果、dG の自動酸化を防ぐことが可能となり、信頼性の高い測定値を得ることが可能となった。



Scheme 2 DNA digestion and determination of dG and 8-OHdG

## 第 1-4 節 液体クロマトグラフィー/蛍光検出によるチロシン類縁化合物の測定

生体試料中のパラチロシン (*p*-Tyr) は液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーにより分離し、質量分析計 (MS)<sup>22)</sup>、タンデム質量分析計 (MS/MS)<sup>23,24)</sup> で測定する方法が報告されている。しかし、ROS により生成されるオルトチロシン (*o*-Tyr) およびメタチロシン (*m*-Tyr)、RNS により生成されるニトロフェニルアラニン (4-NP) およびニトロチロシン (3-NT) は *p*-Tyr、フェニルアラニン (Phe) と比較し、生体内に極微量で存在していると考えられる。これら化合物を測定するためには、生体試料中に存在する他の夾雑物と分離を行い、高感度・選択的に検出する必要がある。

MS は分子量で測定を行うことから、他の検出器と比較して、選択性の高い分析法である<sup>25,26)</sup>。しかし、MS で生体試料など複雑なマトリクスが存在する試料を測定する場合、イオン化を行うインターフェイス部においてエネルギーの分散が起こり、イオン化抑制と言われる現象が起こる<sup>27)</sup>。この現象によって、標準品と実試料をそれぞれ測定した場合、イオン化強度に大きな差が生じ、精度の高い分析が困難となる。そのため、MS で精度の高い定量を行うためには、実試料の前処理を十分に行うとともに、安定同位体でラベル化された物質 (サロゲート物質) によって補正をかけて測定を行う必要がある<sup>28,29)</sup>。しかし、サロゲート物質は同位体元素を用いて合成を行うため、市販されていないことが多い。

本研究では、MS に代わる高感度・選択性の高い蛍光検出器を用い、ROS および RNS がタンパク質およびアミノ酸へ及ぼす影響を評価するため、ROS と生体内の Phe が反応して生じる *o*-Tyr、*m*-Tyr、また、RNS との反応で生じる 4-NP および 3-NT (Figure 4) の同時分析法の構築を行った。

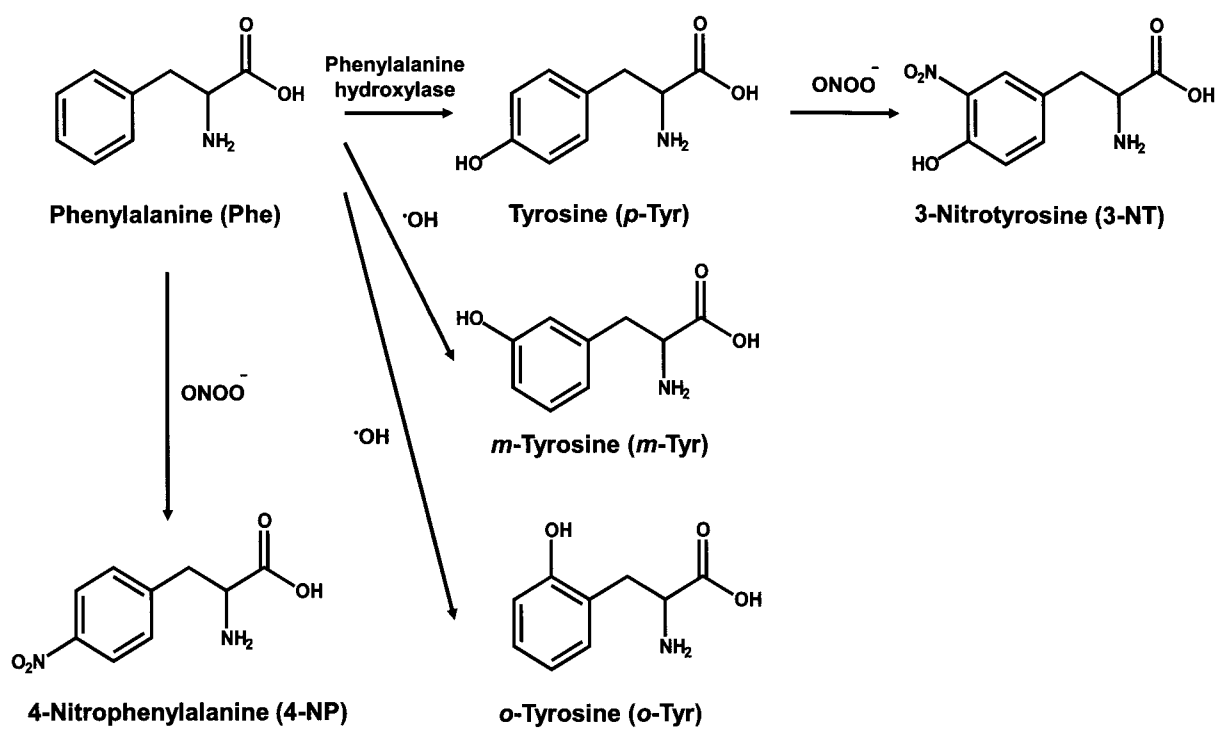


Figure 4 Chemical structures of phenylalanine, tyrosine and their hydroxylated and nitrated compounds

#### 第 1-4-1 項 各種蛍光誘導体化の比較検討

アミノ酸は非常に極性が高く、そのままでは逆相クロマトグラフィー（RPC）で保持させることができない。また、アミノ酸自身は紫外・可視領域に特定の吸収や蛍光も持たないことから、高感度な分析は困難である。そのため、必須アミノ酸などは、蛍光誘導体化を行い、蛍光検出器で測定する方法が報告<sup>30-32)</sup>されている。しかし、ROS および RNS によって産生されると考えられる、*o*-Tyr、*m*-Tyr、4-NP および 3-NT の蛍光誘導体化に関する詳細な報告はされていない。そこで本研究では、水酸化およびニトロ化が蛍光強度に与える影響を調べるとともに、測定対象物質の極性を低下させ、且つ、蛍光を持たせることを目的に、さまざまな蛍光誘導体化試薬を比較検討した（Figure 5 および Table 2）。蛍光誘導体化試薬を比較検討したところ、4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole（DBD-F）、9-Fluorenylmethyl chloroformate（Fmoc-Cl）、2,3-Naphthalenedialdehyde（NDA）および *o*-Phthalaldehyde（OPA）を使用した場合、4-NP および 3-NT は発蛍光性を持たなかったため、蛍光検出器による高感度な分析が達成できなかった。しかし、4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole（NBD-F）を蛍光誘導体化試薬として用いた場合、全ての測定対象物質を発蛍光物質に誘導体化することができ、良好な感度を得ることができた（Table 2 および Figure 6）。そこで、NBD-F の誘導体化最適条件を検討したところ、チロシン類縁化合物は 50 mM リン酸塩緩衝液（pH 9.0）を用いた場合、誘導体化試薬の濃度は 10 mM で反応時間が 5 分間で完了し、反応が速やかに進行した（Figure 7）。

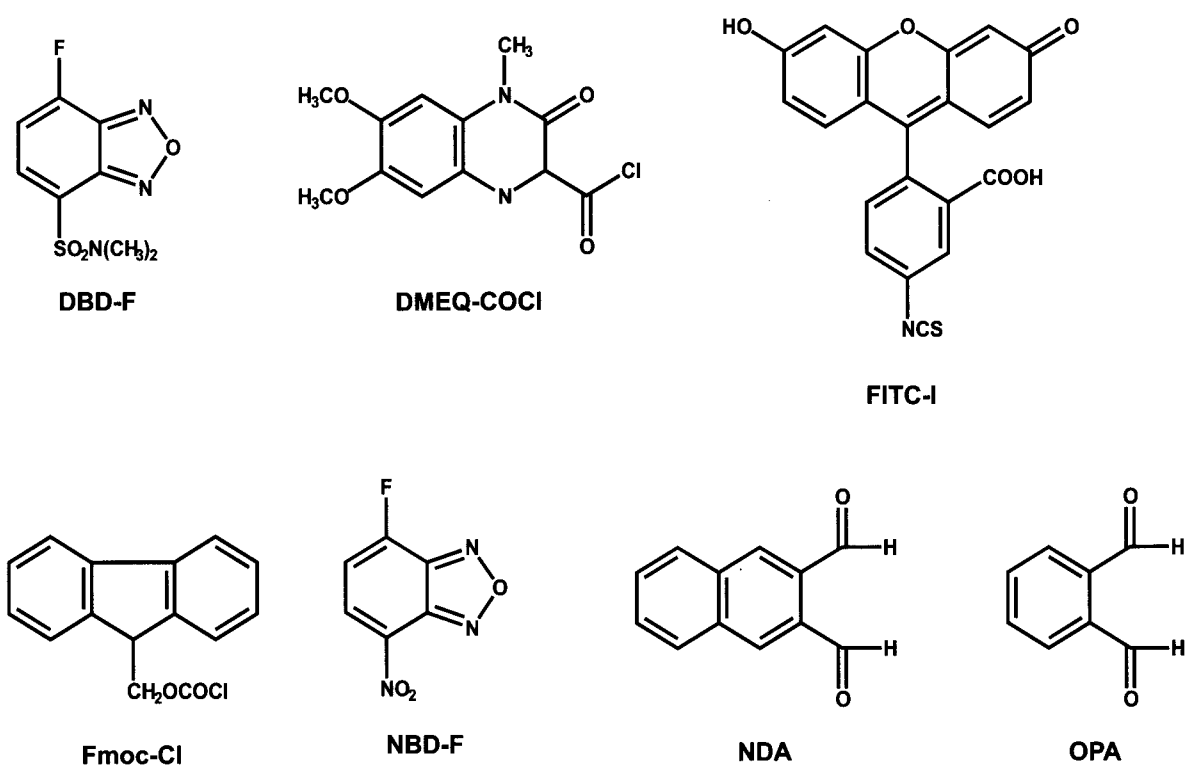
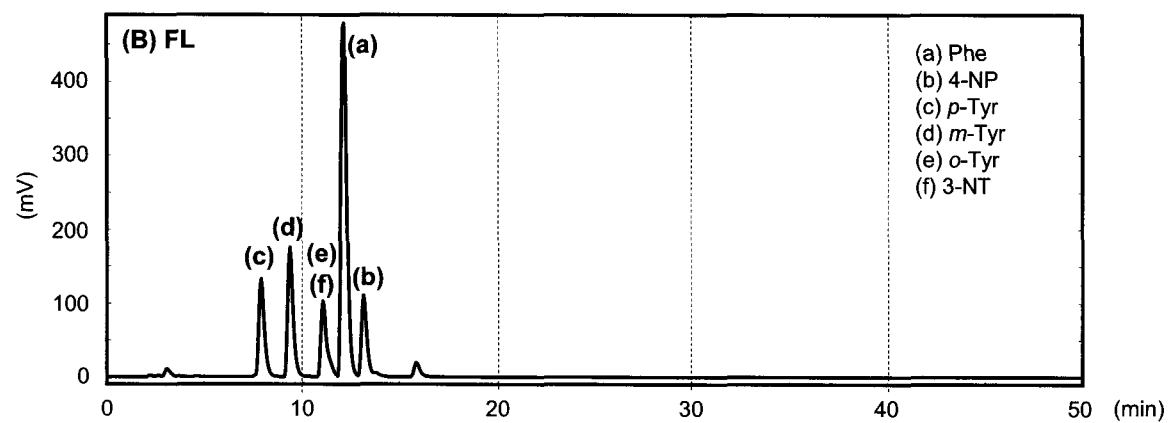
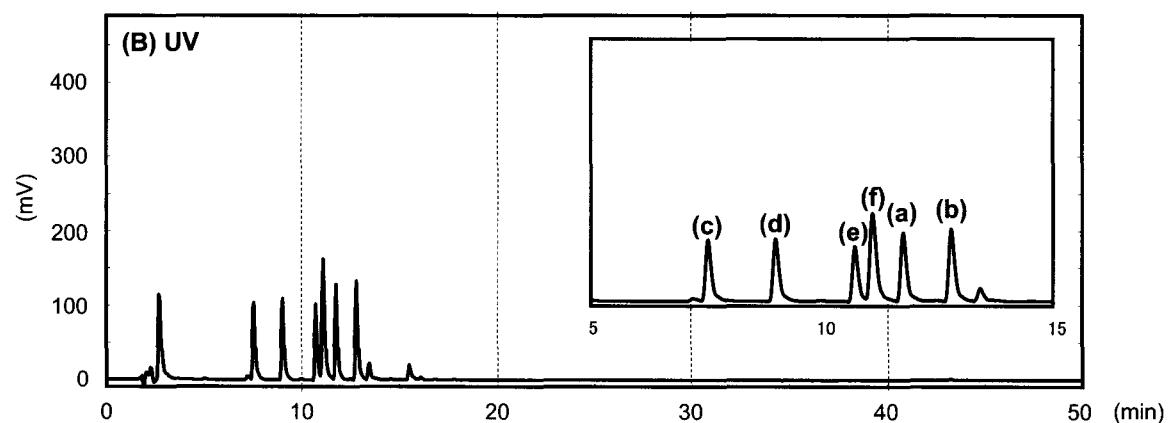
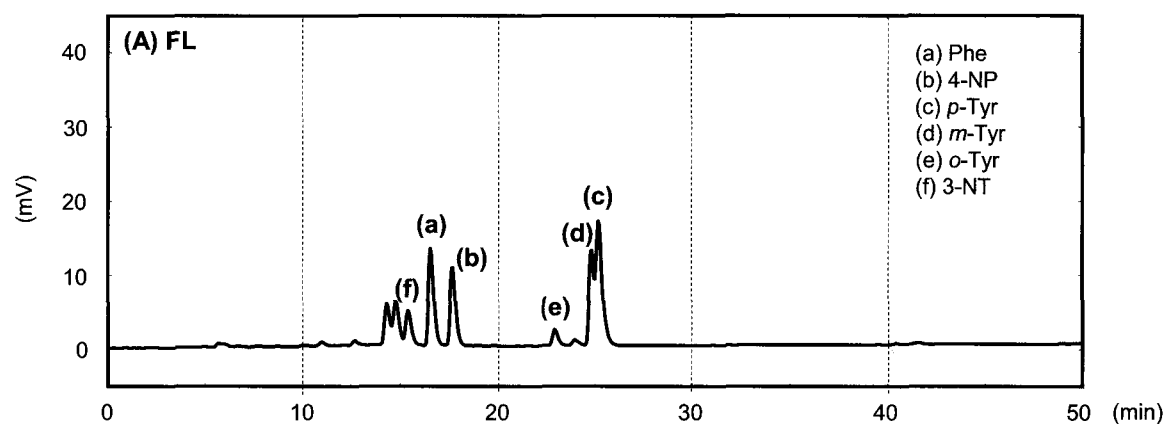
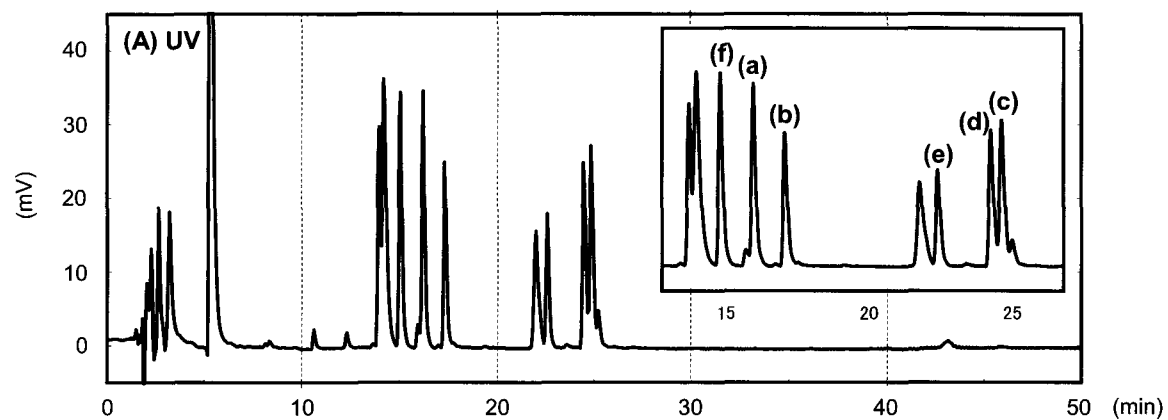
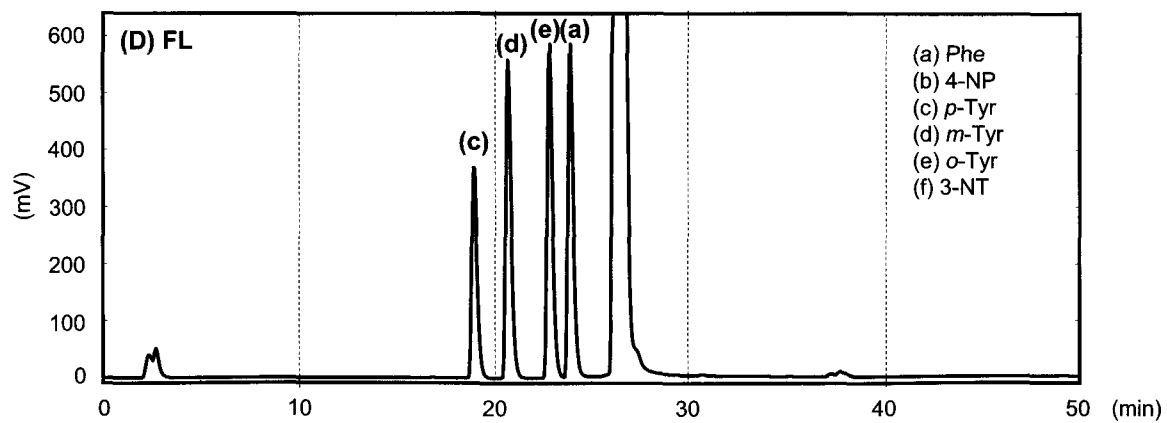
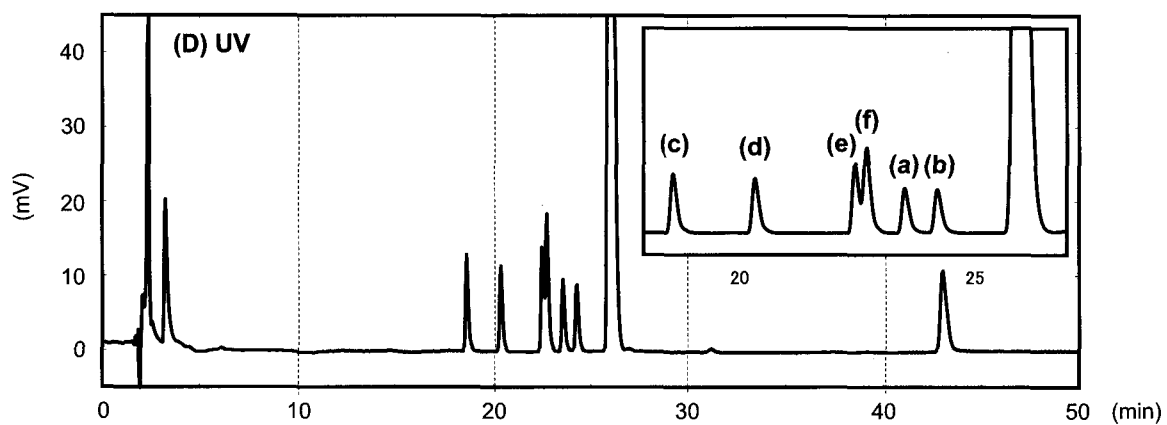
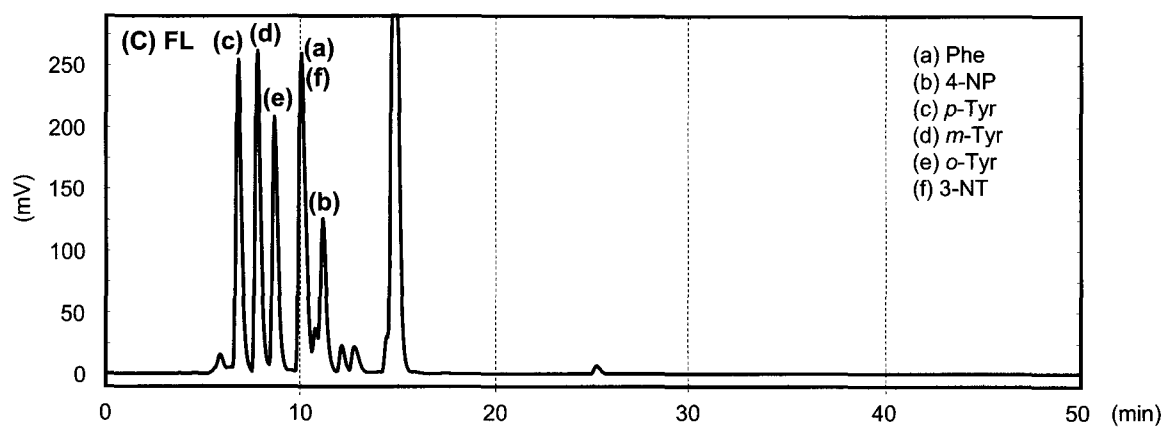
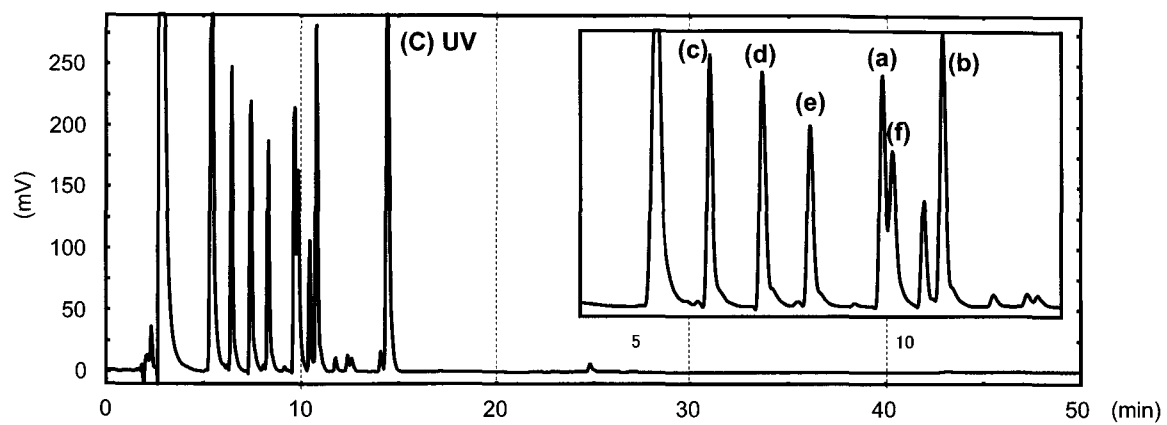


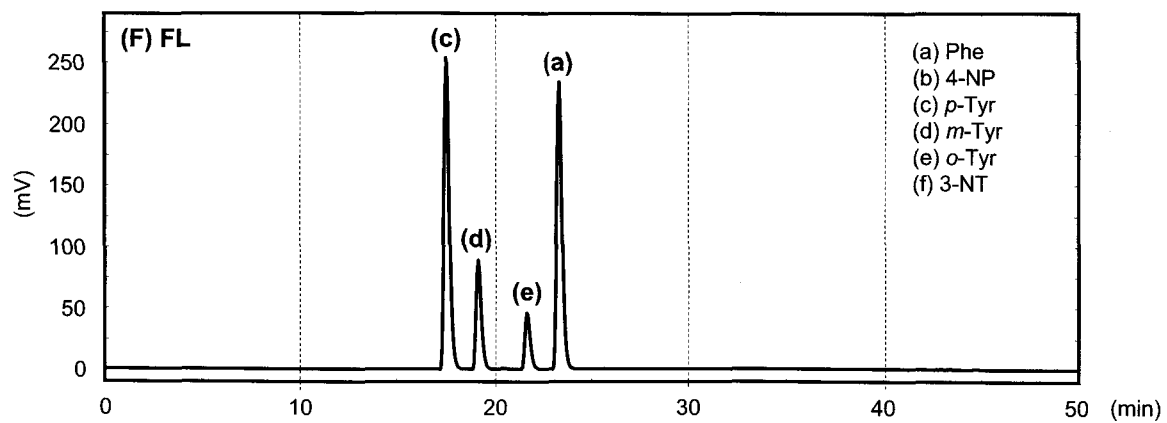
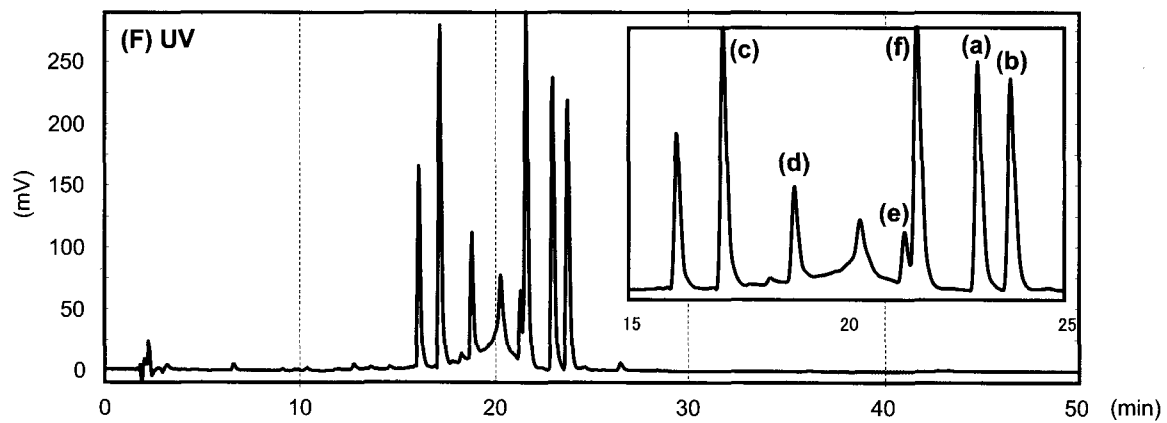
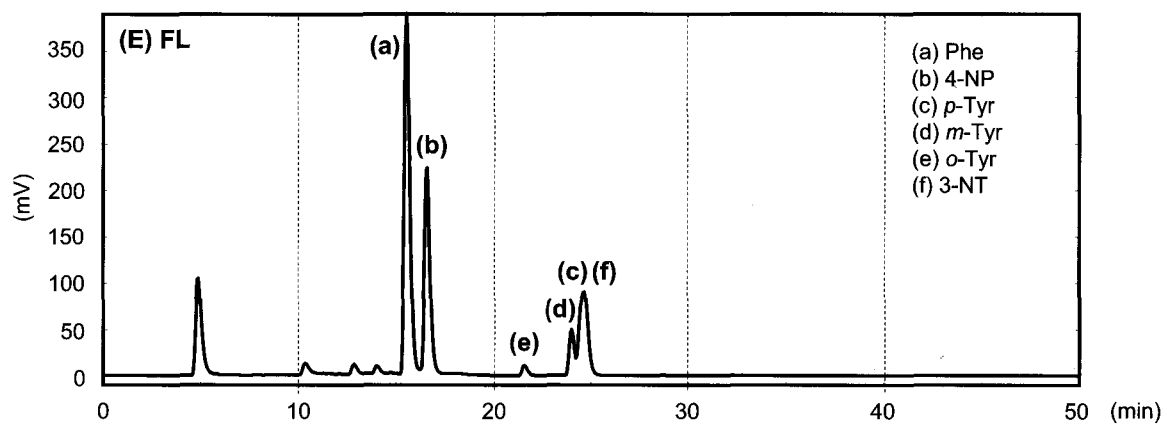
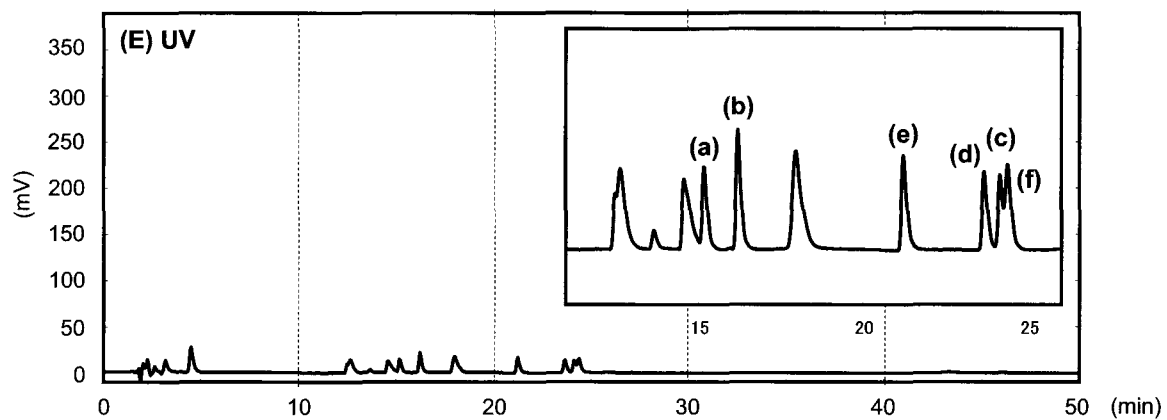
Figure 5 Chemical structures of FL reagents

Table 2 Optimum reaction conditions and comparison of LOD of hydroxylated and nitrated compounds with FL reagents

FL reagent	Reaction condition	Wavelength (nm)		LOD (nM) (S/N = 3)					
		Ex	Em	Phe	4-NP	<i>p</i> -Tyr	<i>o</i> -Tyr	<i>m</i> -Tyr	3-NT
DBD-F	50 mM PBS (pH 10) 60°C, 3 h	468	535	690	531	422	1298	355	1166
DMEQ-COCl	50 mM PBS (pH 10) 37°C, 10 min	408	478	1.0	9.9	10.3	50.6	10.1	60.3
FITC-I	50 mM PBS (pH 10) 60°C, 2 h	442	520	89.7	150	88.9	90.8	89.4	523
Fmoc-Cl	50 mM PBS (pH 12) 37°C, 1 h	265	313	5.0	6952	2.3	1.6	1.7	927
NBD-F	50 mM PBS (pH 9) 60°C, 5 min	470	540	1.2	2.2	15.6	26.1	68.1	13.7
NDA	50 mM PBS (pH 10) 37°C, 30 min	401	464	5.0	N.D.	5.0	28.5	24.8	N.D.
OPA	50 mM PBS (pH 10) 37°C, 1 h	340	450	101	N.D.	80.9	3544	87.4	N.D.









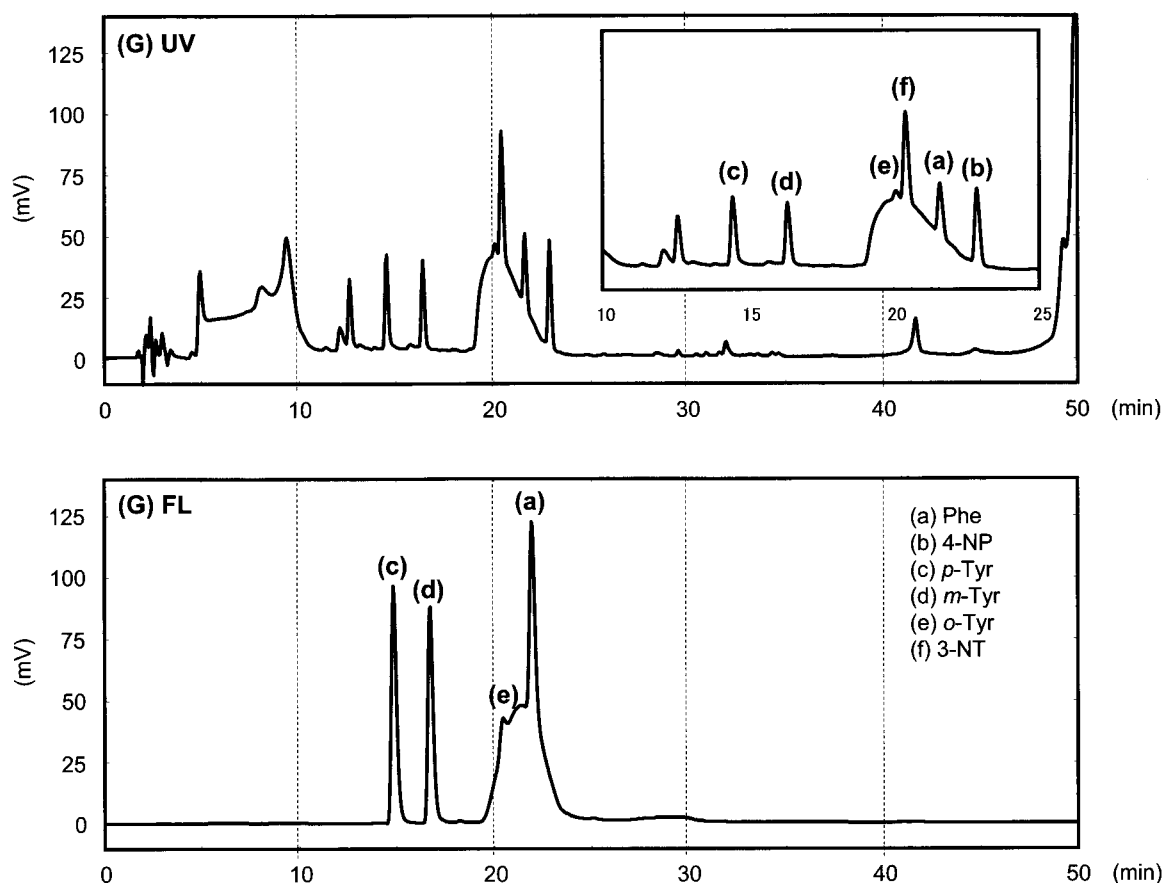


Figure 6 UV and FL chromatograms for determination of hydroxylated phenylalanine and nitrated tyrosine (50  $\mu$ M) products with derivatization by several reagents

The derivatized standards were separated with a CAPCELL PAK C18 MGII (150  $\times$  2.0 mm, 3  $\mu$ m) and a gradient mobile phase consisting of 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) (solvent A) and acetonitrile (solvent B). A gradient program was used according to the following profile: 0-50 min, 10-60% B.

(A) DBD-F, (B) DMEQ-COCl, (C) FITC-I, (D) Fmoc-Cl, (E) NBD-F, (F) NDA and (G) OPA.

(a) Phenylalanine, (b) 4-nitrophenylalanine, (c) *p*-tyrosine, (d) *m*-tyrosine, (e) *o*-tyrosine and (f) 3-nitrotyrosine.

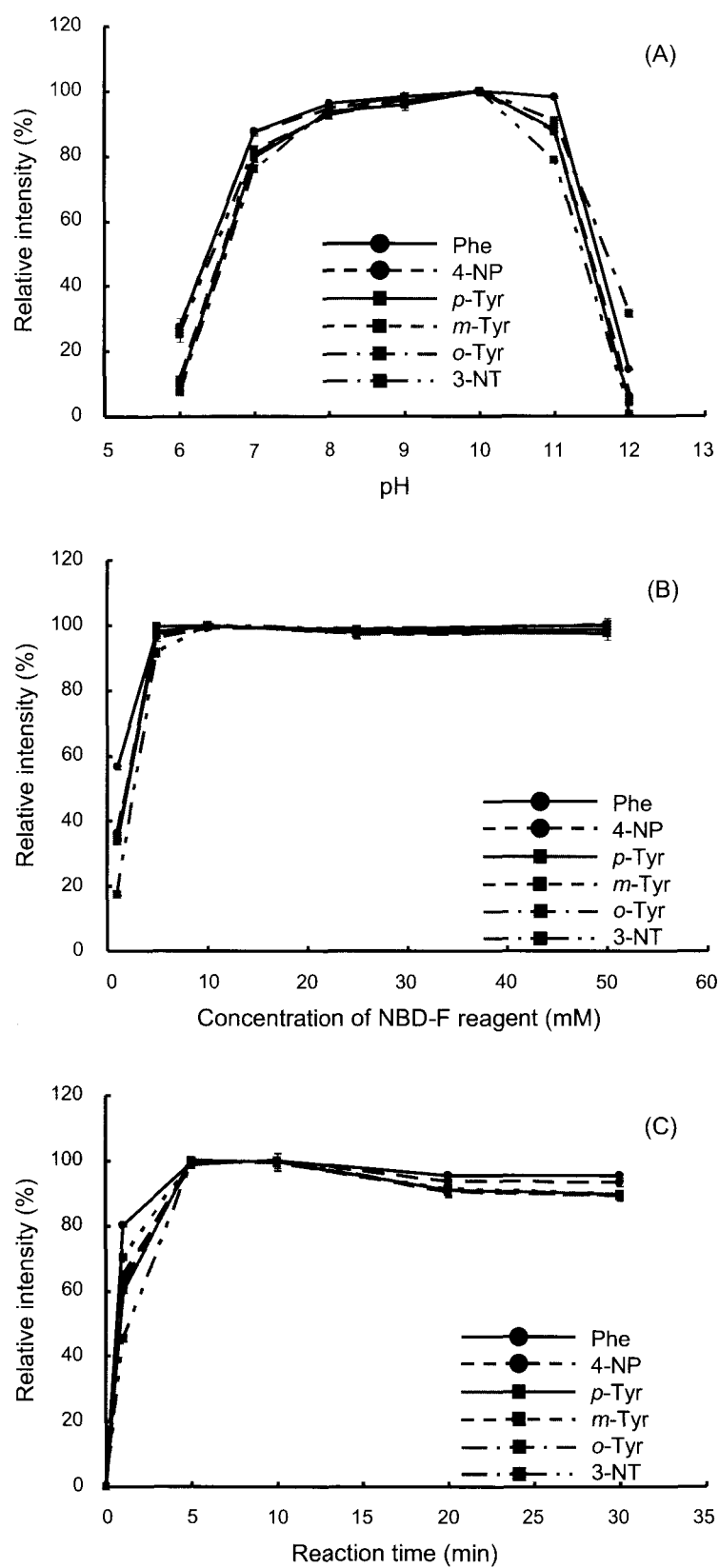


Figure 7 Effect of (A) pH of reaction buffer, (B) concentration of NBD-F and (C) reaction time for derivatization

#### 第 1-4-2 項 LC 測定条件の最適化

NBD-F 誘導体の蛍光強度や LC における保持時間は、移動相の pH の影響を受けることが知られている<sup>33)</sup>。そこで、移動相の pH が測定対象物質の感度および分離に与える影響を調べるために、pH を 3～7 の範囲で検討した (Figure 8)。その結果、pH が低下するに従い、面積の増加が認められた。しかし、pH を下げることによって、一部の化合物については、カラムへの保持が強くなることでシグナルの高さが減少し、測定感度の低下を招いた。この結果を踏まえ、本研究では 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 3.0) とアセトニトリルを移動相として選択し、グラジエント操作によって相互分離を達成した。

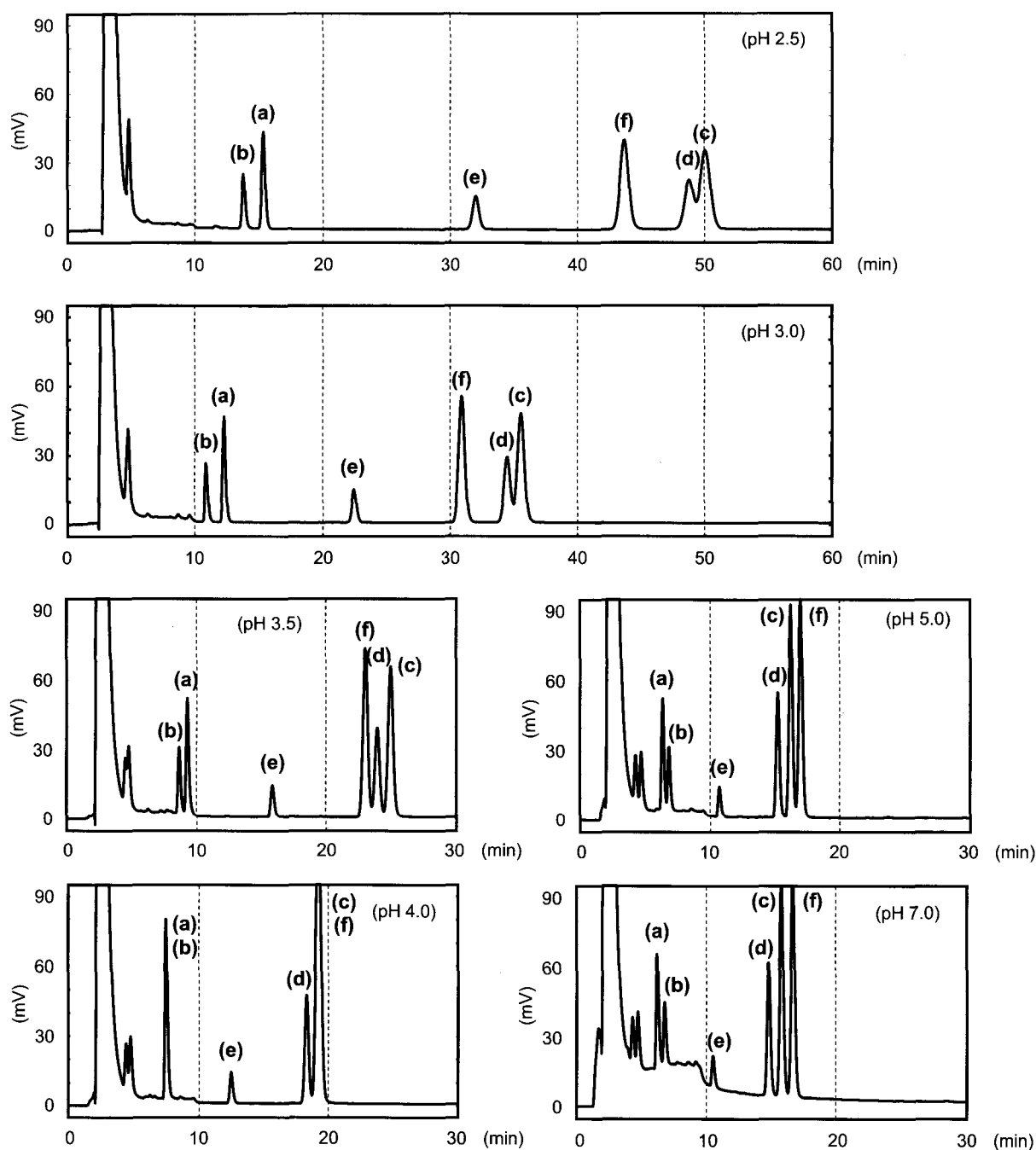


Figure 8 Effect of mobile phase pH (2.5-7.0) on separation of analytes

Chromatographic separation was achieved with a CAPCELL PAK C18 MGII (150 × 2.0 mm, 3 μm) and a gradient mobile phase consisting of 20 mM sodium phosphate buffer (solvent A) and acetonitrile (solvent B). A gradient program was used according to the following profile: 0-5 min, 20-30% B; and 5-40 min, 30% B.

(a) Phenylalanine (0.1 μM), (b) 4-nitrophenylalanine (0.1 μM), (c) *p*-tyrosine (1 μM), (d) *m*-tyrosine (1 μM), (e) *o*-tyrosine (1 μM) and (f) 3-nitrotyrosine (1 μM).

### 第 1-4-3 項 固相抽出法による前処理方法の検討

生体試料として選択した血清中には測定対象物質以外に多量のアミノ酸が含まれている<sup>34)</sup>ことから、夾雑物の影響を大きく受けると考えられた。そこで、精製を目的とした生体試料の前処理方法として、Waters 社製 Oasis<sup>®</sup> HLB および MCX を用いた固相抽出法を検討した。Oasis<sup>®</sup> HLB を用いたところ、*p*-Tyr は HLB カートリッジに保持されず、良好な回収率が得られなかった。しかし、逆相-陽イオン交換系カートリッジである Oasis<sup>®</sup> MCX を検討したところ、目的物質をカートリッジに保持させることが可能となった。

固相抽出条件として、洗浄溶媒および溶出溶媒を比較検討した。Figure 9 に示す通り、pH および塩濃度を高くするに従い、回収率の低下が認められた。そのため、洗浄溶媒は 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.0)、溶出溶媒を 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 11.0) に設定した。この条件で添加回収試験を行ったところ、回収率は 93.9~110.5%と良好な結果を得ることができた。

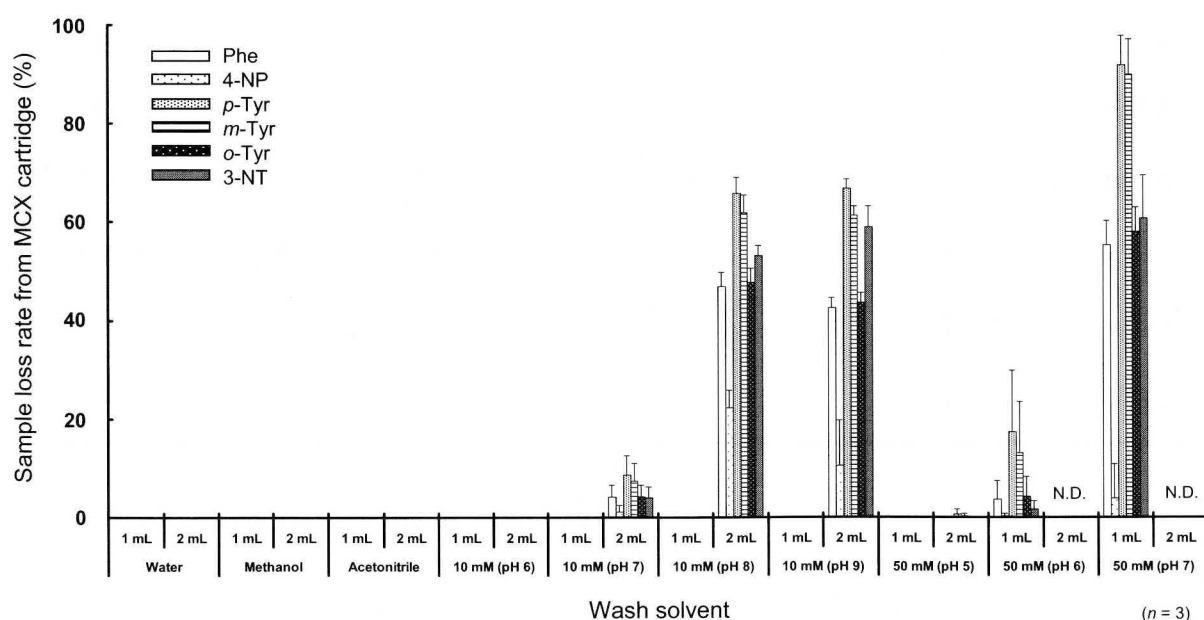


Figure 9 Optimization of wash conditions for solid-phase extraction

Washing solvents were prepared with sodium phosphate buffer.

N.D.; Not determined.

#### 第 1-4-4 項 分析法バリデーション

構築した分析法の妥当性を評価するために、FDA で推奨されている分析法バリデーション<sup>35)</sup>に従い、検出限界 (MDL)、定量限界 (MQL)、真度および精度を求めた。MQL は 4-NP、*m*-Tyr および 3-NT で 0.1  $\mu$ M と高感度な分析法が構築できた (Table 3)。また、検量線範囲内で良好な直線性が得られ、真度、精度ともに RSD が 15%以内と再現性の高い分析法が達成された (Table 4)。

Table 3 Method validation results of phenylalanine, tyrosine and their hydroxylated and nitrated compounds

Analyte	Detector	Calibration range ( $\mu$ M)	MDL* ( $\mu$ M)	MQL** ( $\mu$ M)	r
Phe	UV	10-1000	3	10	0.9999
4-NP	FL	0.1-10	0.03	0.1	0.9999
<i>p</i> -Tyr	UV	10-1000	3	10	0.9999
<i>m</i> -Tyr	FL	0.1-10	0.03	0.1	0.9999
<i>o</i> -Tyr	FL	1-100	0.3	1	0.9999
3-NT	FL	0.1-10	0.03	0.1	0.9999

\*MDL: S/N = 3

\*\*MQL: S/N > 10, precision and accuracy < 20%

Table 4 Recovery rates of QC samples during routine analysis

	LQC	HQC		LQC	HQC
Phe	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	<i>m</i> -Tyr	0.1 $\mu$ M	1 $\mu$ M
Recovery (%)	99.9	95.7	Recovery (%)	93.9	96.2
Intra-day (%RSD)	3.1	1.0	Intra-day (%RSD)	6.0	2.3
Inter-day (%RSD)	2.1	4.4	Inter-day (%RSD)	2.1	3.0
4-NP	0.1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	<i>o</i> -Tyr	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M
Recovery (%)	110.5	107.9	Recovery (%)	101.9	98.5
Intra-day (%RSD)	8.8	9.3	Intra-day (%RSD)	7.3	2.4
Inter-day (%RSD)	8.1	10.3	Inter-day (%RSD)	3.9	4.3
<i>p</i> -Tyr	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	3-NT	0.1 $\mu$ M	1 $\mu$ M
Recovery (%)	101.1	101.4	Recovery (%)	99.7	95.2
Intra-day (%RSD)	8.7	2.5	Intra-day (%RSD)	10.2	2.8
Inter-day (%RSD)	3.9	6.6	Inter-day (%RSD)	6.0	3.0

LQC: low quality control  
HQC: high quality control

#### 第 1-4-5 項 活性酸素種および活性窒素種がチロシン類縁化合物の酸化および窒素化に与える影響

ROS および RNS が *p*-Tyr および Phe の酸化およびニトロ化に及ぼす影響を調べるために、ヒト血清との反応を試みた。ROS として反応性の高い $\cdot\text{OH}$  はフェントン反応によって発生させ、RNS はペルオキシナイトライト溶液を用い、それぞれ血清と反応させた。その結果、血清からは *p*-Tyr と Phe のみが検出されたが、 $\cdot\text{OH}$  と反応させることによって、*o*-Tyr および *m*-Tyr の生成が確認された。また、ペルオキシナイトライトによって、4-NP および 3-NT の生成が確認され (Figure 10)、ペルオキシナイトライトの濃度に依存して、4-NP および 3-NT の生成量が増加していた。しかし、4-NP と比較して 3-NT は高い濃度で検出されたことから、RNS のマーカーとして、3-NT の方が有用であると推察された (Figure 11)。



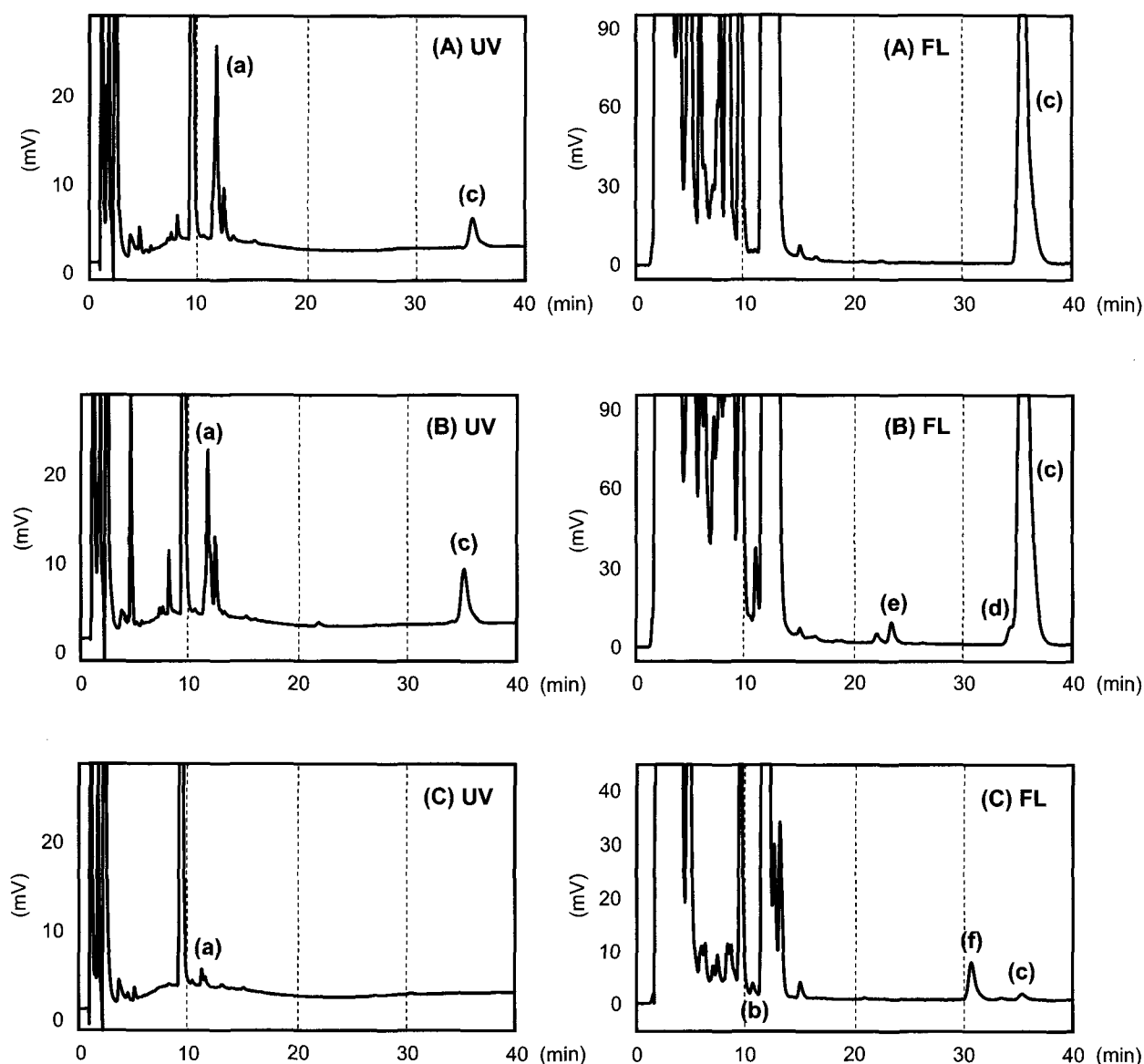


Figure 10 Chromatograms of (A) blank serum sample, (B) serum hydroxylated with  $\cdot\text{OH}$  by Fenton reaction and (C) serum nitrated with peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ )

Chromatographic separation was achieved using a CAPCELL PAK C18 MGII ( $150 \times 2.0$  mm,  $3 \mu\text{m}$ ) and gradient mobile phase consisting of 20 mM sodium phosphate buffer (pH 3.0) (solvent A) and acetonitrile (solvent B). A gradient program was used according to the following profile: 0-5 min, 20-30% B; and 5-40 min, 30% B.

(a) Phenylalanine, (b) 4-nitrophenylalanine, (c) *p*-tyrosine, (d) *m*-tyrosine, (e) *o*-tyrosine and (f) 3-nitrotyrosine.

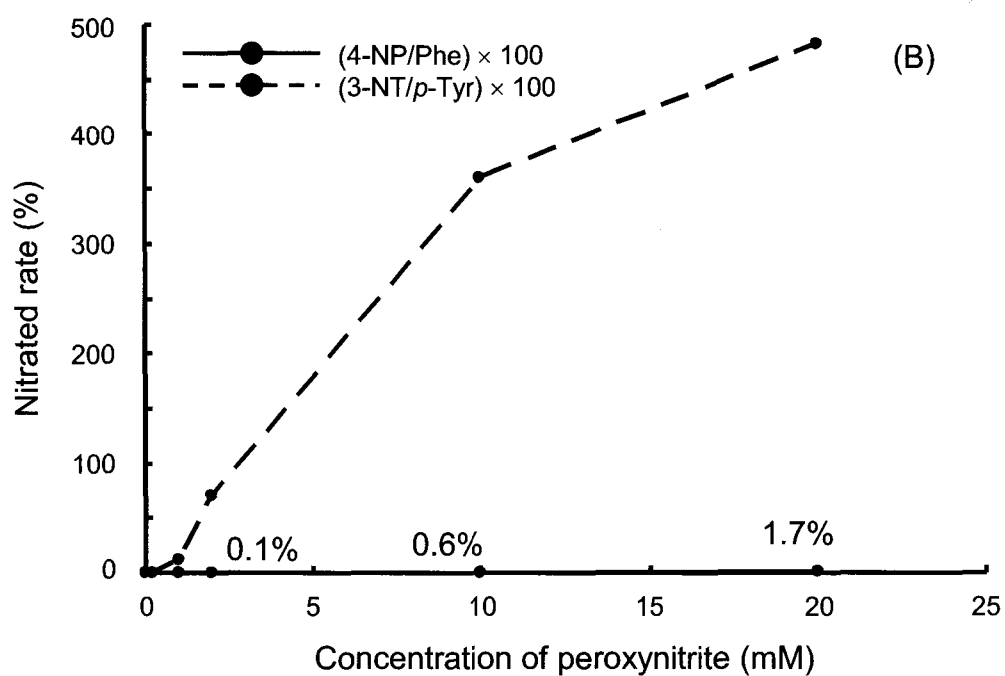
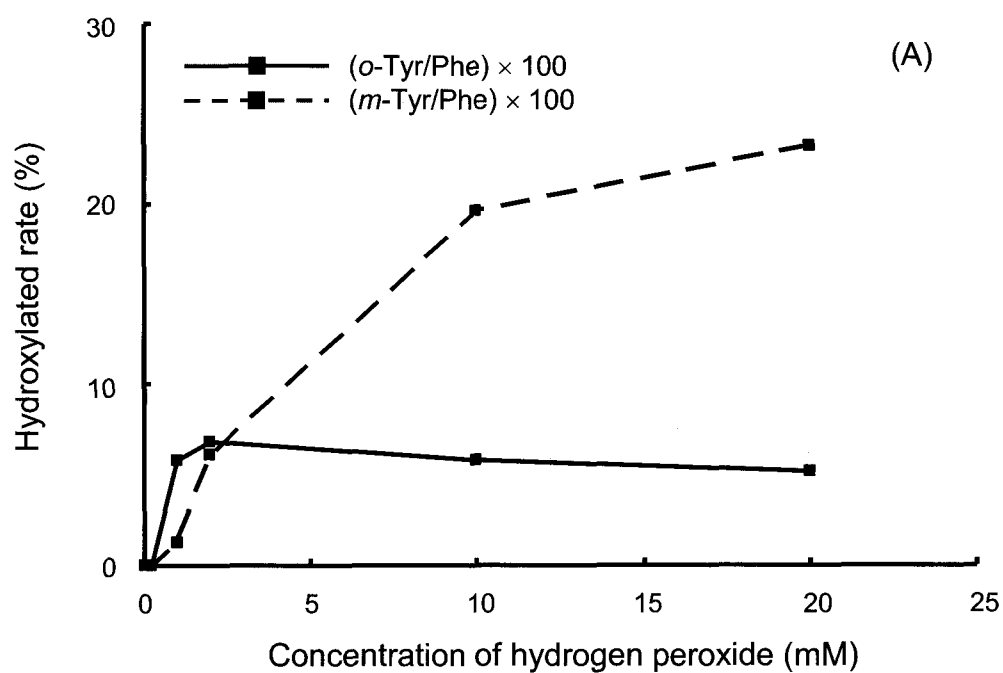


Figure 11 Hydroxylated phenylalanine and nitrated tyrosine formation in human serum treated with (A) hydrogen peroxide or (B) peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)

第 1-5 節 カラムスイッチング-親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法による  
生体試料中のチオール化合物分析法の構築

生体中には GSH など抗酸化物質が多く存在している<sup>36,37)</sup>。GSH は ROS および RNS と反応することで、GSSG へと変化する<sup>38,39)</sup>。そのため、還元型および酸化型チオール化合物を測定することは、酸化および窒素化ストレスの評価が可能であると考えられる。しかし、GSH を始め、さまざまなチオール化合物は高極性であるため、RPC による分離および生体試料の前処理が困難である。

本研究では、生体内チオール化合物（GSH、GSSG、システイン: Cys、シスチン: CysSS、ホモシステイン: Hcy およびホモシスチン: HcySS）を測定対象物質として選定し（Figure 12）、高極性物質の保持が可能な親水性相互作用クロマトグラフィー（hydrophilic interaction chromatography: HILIC）を用いた真度・精度の高い分析法を検討した。

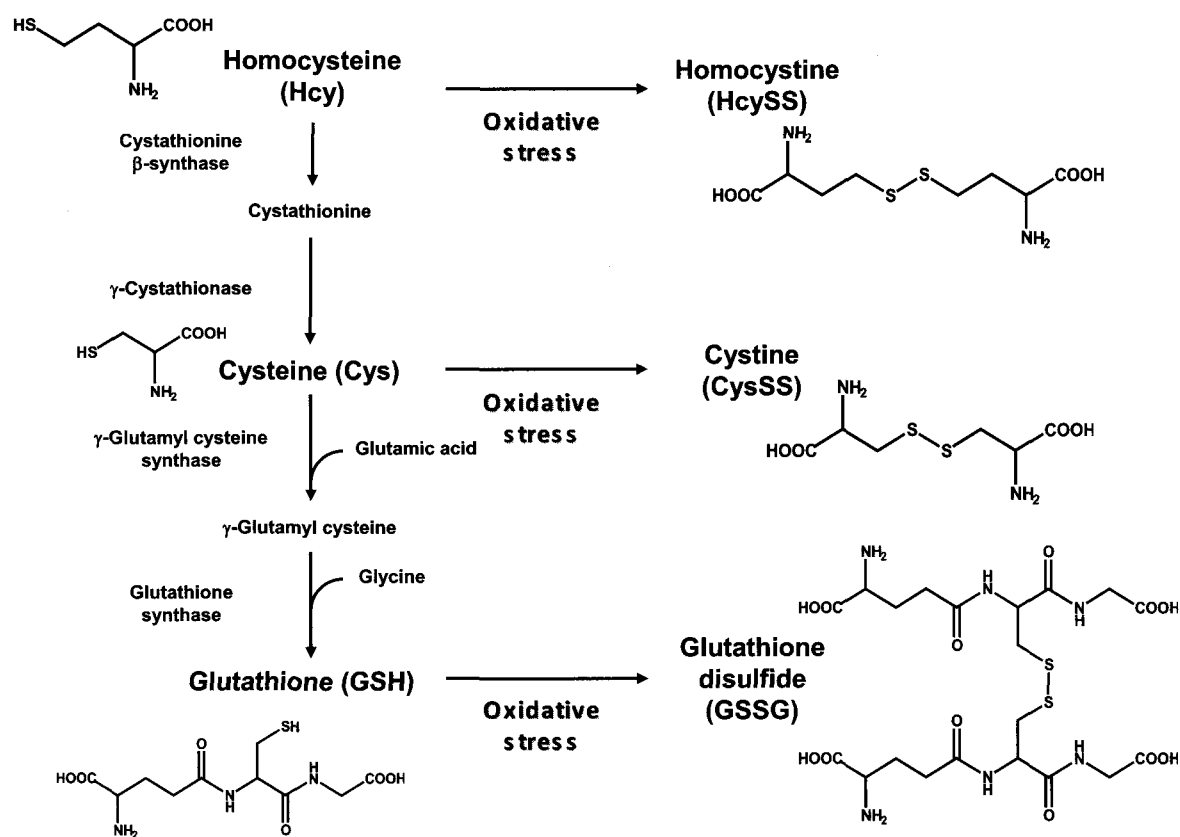


Figure 12 Metabolic pathway and chemical structures of reduced and oxidized thiol compounds

# 第 1-5-1 項 自動酸化を防ぐための誘導体化試薬の検討

測定対象物質である還元型チオール化合物は、チオール基を有しており、溶存酸素や金属の影響で自動酸化を受ける<sup>40)</sup>。そのため、チオール基を保護し、酸化型への転換を防ぐ誘導体化を行う必要があり、従来、GSH を測定するために、さまざまな誘導体化試薬が使用されてきた<sup>41-43)</sup>。

それらの中で、MS で高感度な測定を可能にするための誘導体化試薬が開発されている<sup>44-46)</sup>。この誘導体化試薬は、測定対象物質の極性を下げ、イオン化部においてクーロン爆発を起こさせ易くすることでイオン化効率が促進し、高感度測定を達成させることができる<sup>47,48)</sup>。

そこで本研究においても、還元型チオール化合物の保護と、MS でのイオン化の促進を目的に、マレイミド骨格を有する誘導体化試薬を比較検討した。その結果、今回検討した全ての誘導体化試薬は還元型チオールの保護ができることが明らかとなった。その中でも、*N*-Ethylmaleimide (NEM)、*N*-Cyclohexylmaleimide (NCycloM) および *N*-Benzylmaleimide (NBenzM) を用いた際に誘導体化の反応速度が大きく、MS でのイオン化の促進が認められた (Table 5)。

Table 5 Comparison of maleimide derivatization reagents for reduced glutathione

Derivatization reagent	Relative intensity	Reaction rate (25°C; M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Maleimide	11.3	0.144
<i>N</i> -Methylmaleimide	16.1	0.405
<i>N</i> -Ethylmaleimide	17.6	0.466
<i>N</i> -Propylmaleimide	18.1	0.180
<i>N</i> - <i>tert</i> -Butylmaleimide	18.7	0.070
<i>N</i> -Phenylmaleimide	16.4	0.248
<i>N</i> -Cyclohexylmaleimide	18.8	0.460
<i>N</i> -Benzylmaleimide	17.9	0.492
<i>N</i> -( <i>o</i> -Chlorophenyl)maleimide	12.2	0.352

## 第 1-5-2 項 2 段階誘導体化条件の最適化

還元型チオール化合物はチオール基を有していることから誘導体化を行うことが可能である。しかし、酸化型チオール化合物は、チオール基がジスルフィド結合しているため、誘導体化を行うことができない。従来、還元型および酸化型チオール化合物をそれぞれ定量するためには、先ず還元型チオール化合物のみを誘導体化して測定を行う。その後、同一試料を化学的に還元させてから誘導体化を行い、全還元型チオール量として測定する。全還元型チオール量から還元型チオール量を差し引くことで、酸化型チオール量を決定していた。この方法は、前処理操作が煩雑であるうえ、同一試料について測定を 2 度行う必要があるため、1 試料あたりの分析時間が長くなる。そこで本研究では、1 つの試料に対して 2 種類の誘導体化試薬を用いて連続的に 2 段階で誘導体化を行い、還元型および酸化型チオール化合物を同時に測定できる方法の構築を試みた。

第 1-5-1 項で選定した誘導体化試薬の最適な反応条件を検討するために、添加する誘導体化試薬の濃度を検討した。Figure 13(A)に示す通り、NBenzM を 10 mM に設定した場合、GSH、Cys および Hcy は全て反応した。次に、酸化型を還元型に転換させるための還元剤の濃度を検討したところ、ジチオトレイトール (DTT) を 25 mM 添加することで、酸化型を還元型に戻すことができた。最後に、還元されたチオール化合物を誘導体化するために必要な誘導体化試薬の濃度を検討した結果、NCycloM が 50 mM 必要であることが分かった。これらの結果から、NBenzM、DTT および NCycloM の最適添加濃度をそれぞれ 10 mM、25 mM および 50 mM と設定した (Figure 13)。

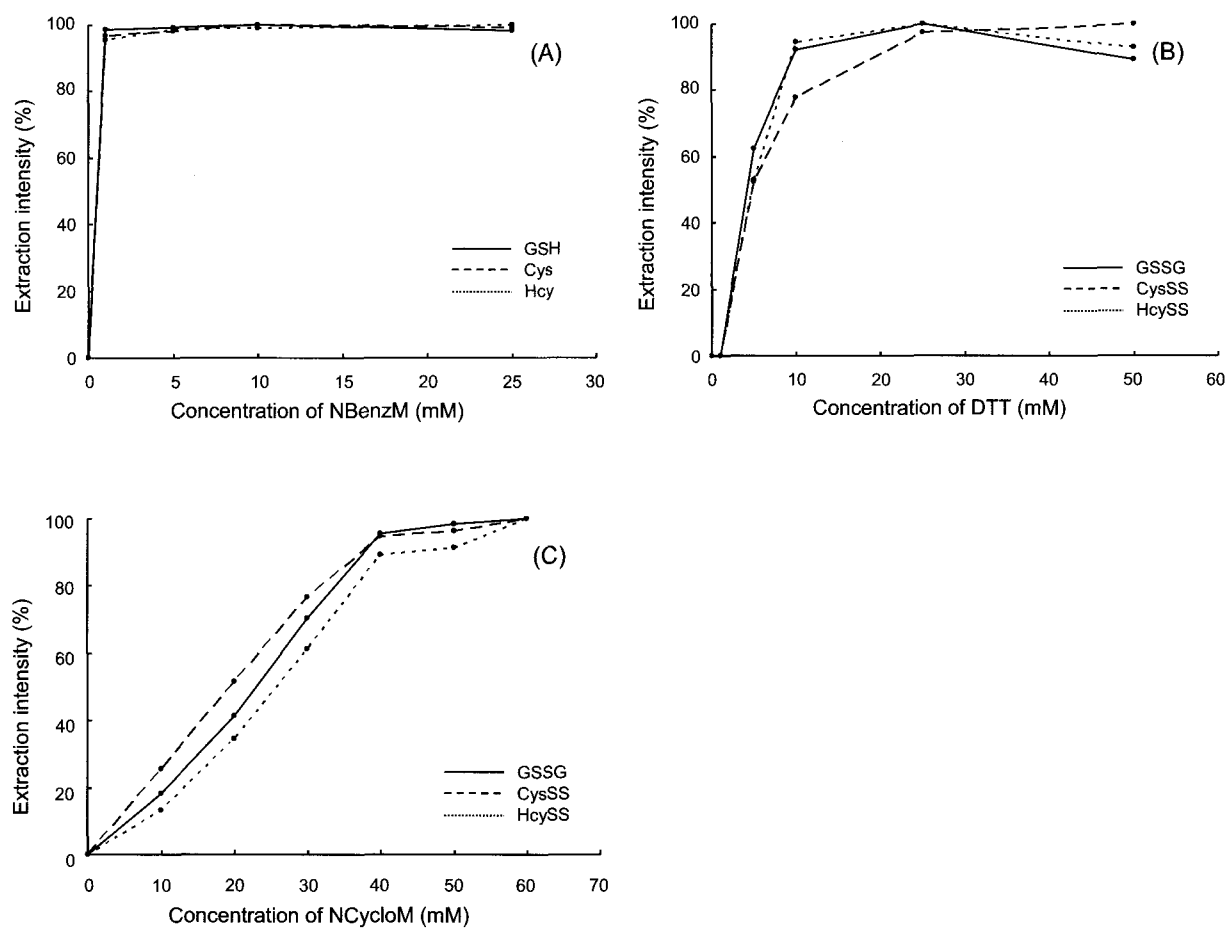


Figure 13 Optimization of concentrations of (A) NBenzM, (B) DTT and (C) NCycloM

### 第 1-5-3 項 HILIC による分離条件の検討およびカラムスイッチング法を用いた 試料前処理操作の自動化

GSH などの、チオール化合物は高極性物質であるため、通常の ODS カラムを用いた RPC では十分な保持が得られない。高極性物質の分離を目的に 1990 年に Alpert によって報告<sup>49)</sup>された HILIC は、高極性のシリカゲルを基本とした固定相をポリスクシンイミドなどで誘導体化し、水やアセトニトリルなどの極性溶媒を移動相とした新しい分離手法である。このクロマトグラフィーは高極性物質の保持が可能であり、現在までにさまざまな報告<sup>50-52)</sup>がなされている。

一方、MS 測定において、弊害となるのがイオン化抑制である<sup>27)</sup>。これは、測定対象物質と夾雑物が同時にイオン化されることによって、エネルギーの分散が起こり、標準品を測定していたときより、イオン化が阻害され、イオン強度が減少することである。特にイオン化抑制が起こり易い夾雑物として塩化ナトリウムやリン脂質などが挙げられる<sup>53)</sup>。そのため、MS で生体試料を測定する場合、試料の前処理方法が重要となってくる。

本研究においては、前処理の自動化を図るため、カラムスイッチング法を検討した (Figure 14)。誘導体化されたチオール化合物の保持と夾雑物質の除去を兼ね備えた条件を検討したところ、Figure 15 に示すように、洗浄溶媒量を 0.9 mL に設定した場合に、最も高いシグナル強度が得られた。最適化されたカラムスイッチング-HILIC/MS 条件で測定したところ、良好なクロマトグラムが得られた (Figure 16)。

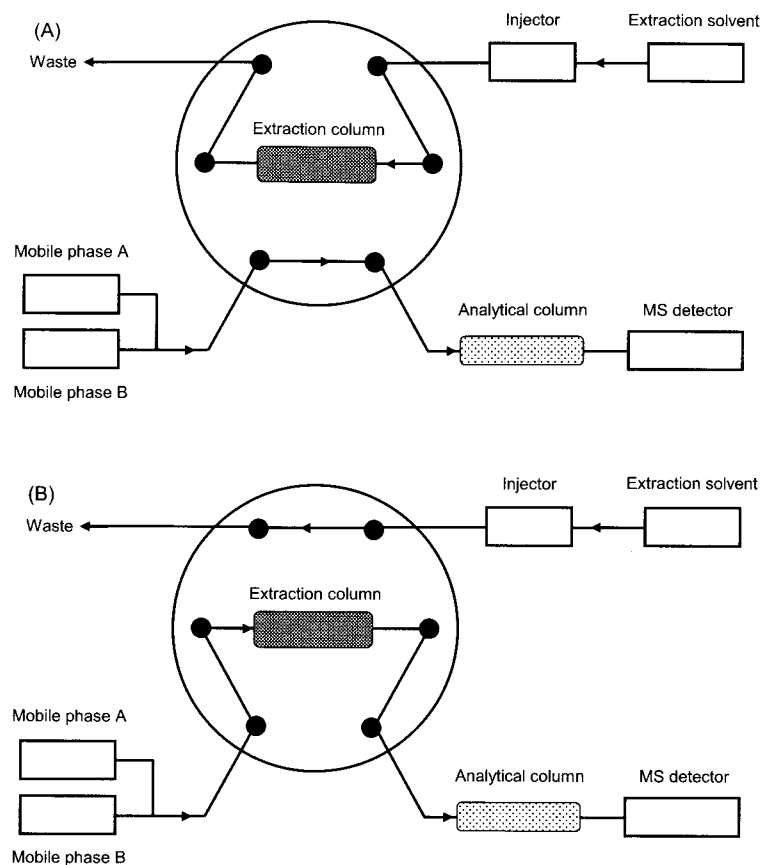


Figure 14 Column-switching system for purification of serum samples

(A) System configuration for sample loading and analysis. (B) System configuration for sample transfer. Online solid-phase extraction was performed on an Oasis HLB column (25  $\mu\text{m}$ ,  $2.1 \times 20$  mm; Waters, Japan) and the separation of analytes, on a ZIC-pHILIC column (5  $\mu\text{m}$ ,  $2.1 \times 100$  mm; Merck, Japan). Mobile phase (A) was 10 mM aqueous acetic acid and (B) was 10 mM acetic acid in acetonitrile. Extraction solvent was water: methanol (90: 10, v/v).

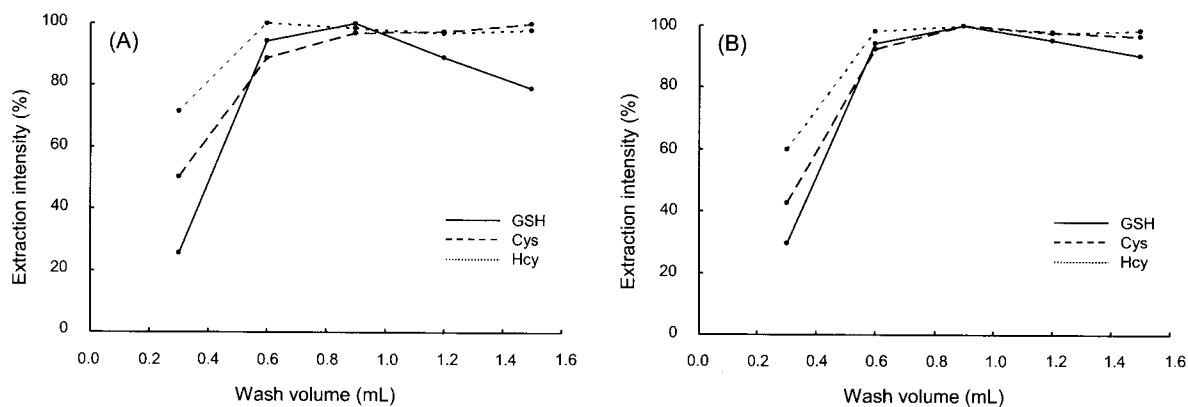


Figure 15 Optimization of wash volume using HLB extraction cartridge

Analytes were derivatized with (A) NBenzM and (B) NCycloM, respectively.



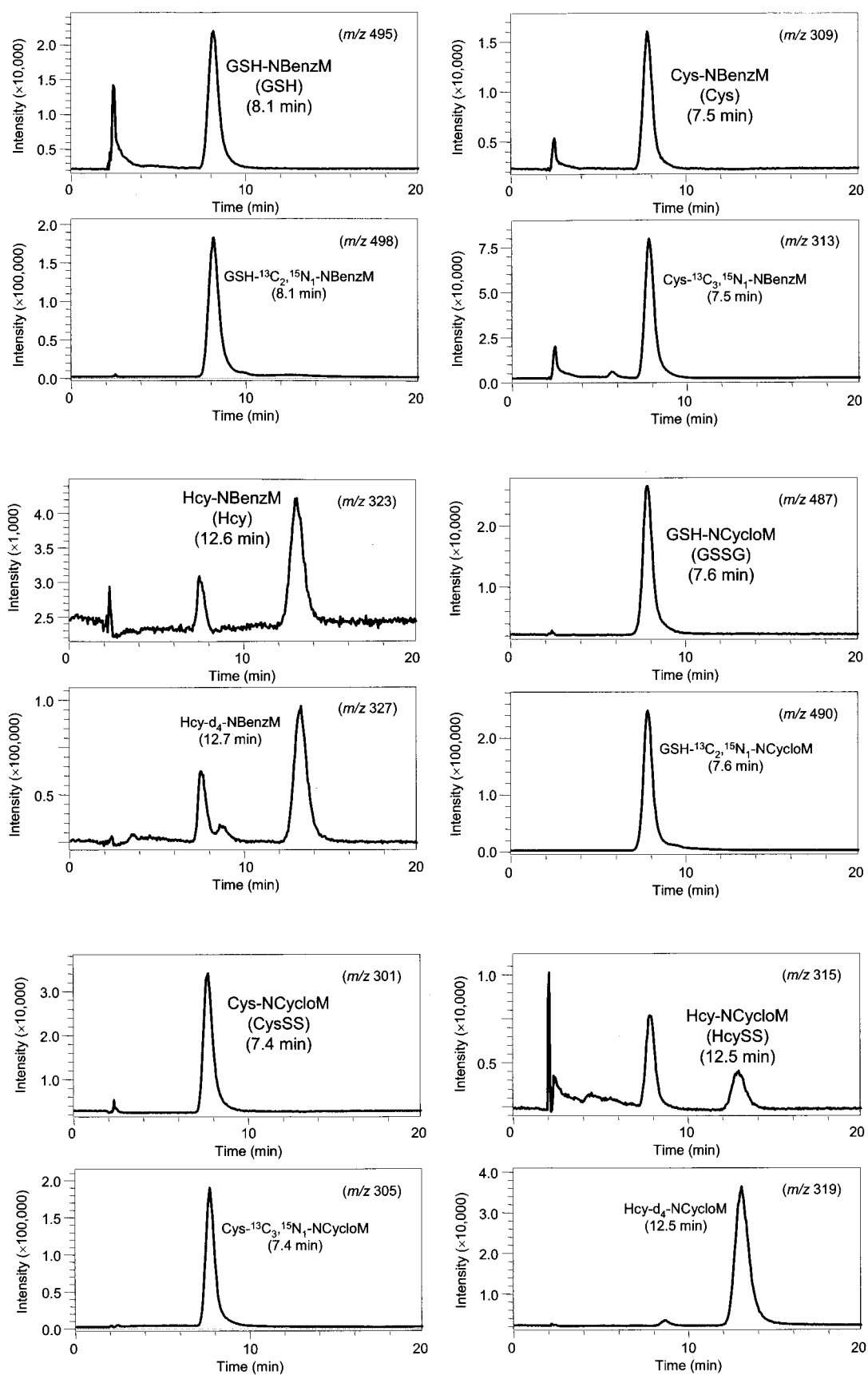


Figure 16 SIM chromatograms of authentic compound treated with NBenzM and NCycloM

#### 第 1-5-4 項 分析法バリデーション

構築した分析法の妥当性を評価するために、試料安定性試験、分析値の真度および精度を求めた。

血清に測定対象物質を添加し、室温、4 °C および -80 °C で保存し、経時的に測定した。その結果、全ての保存条件で還元型チオール化合物は減少し、酸化型チオール化合物が増加することが分かった (Table 6)。これより、採血後、血清を調製する段階で還元型チオール化合物が自動酸化を受けるため濃度が減少し、酸化型チオールが増加することが考えられた。しかし、誘導体化を行うことで、測定対象物質の酸化を抑え、安定に測定できることが示されたことから、本研究では血清を作製する段階で誘導体化を行う方法を検討した。その結果、マウス血清について試料採取の際に、NBenzM で誘導体化を行うことで、測定対象物質の自動酸化を抑えることができ、正確な値が得られることが分かった (Table 7)。

構築した分析法の真度および精度はともに良好な結果が得られ、信頼性が確保された (Table 8)。更に、GSH においては定量限界が 10  $\mu$ M となり、高感度分析法が構築できた (Table 9)。

Table 6 Stability of reduced and oxidized thiols in serum samples under various conditions

\* : freeze-thaw stability of extract (three cycles).

\*\* : sample stability after derivatization step.

Sample stability (mean $\pm$ S.D., %, $n = 6$ )	25°C		4°C	-80°C		
	Before derivatization	15 min	30 min	24 h	1 wk	1 wk*
GSH		58.2 $\pm$ 17.6	31.7 $\pm$ 9.9	9.3 $\pm$ 1.6	26.2 $\pm$ 3.6	10.3 $\pm$ 0.7
GSSG		129.1 $\pm$ 12.3	116.1 $\pm$ 11.6	121.4 $\pm$ 18.1	91.8 $\pm$ 8.0	114.6 $\pm$ 17.4
Cys		49.4 $\pm$ 11.4	36.1 $\pm$ 5.8	21.5 $\pm$ 1.4	30.5 $\pm$ 3.2	22.6 $\pm$ 1.2
CysSS		133.3 $\pm$ 17.2	119.5 $\pm$ 9.9	121.1 $\pm$ 13.9	120.4 $\pm$ 4.5	134.8 $\pm$ 11.8
Hcy		51.6 $\pm$ 18.4	31.2 $\pm$ 8.5	10.0 $\pm$ 1.2	26.2 $\pm$ 4.7	14.5 $\pm$ 1.0
HcySS		137.4 $\pm$ 17.7	160.8 $\pm$ 8.0	128.9 $\pm$ 15.0	181.6 $\pm$ 15.9	179.5 $\pm$ 20.8

Sample stability (mean $\pm$ S.D., %, $n = 6$ )	25°C	4°C (Autosampler condition)	
After derivatization	1 h**	48 h**	120 h**
GSH	101.3 $\pm$ 2.2	103.5 $\pm$ 2.8	101.9 $\pm$ 5.0
GSSG	101.5 $\pm$ 3.2	100.9 $\pm$ 1.9	91.8 $\pm$ 0.8
Cys	99.1 $\pm$ 3.3	99.7 $\pm$ 2.2	101.1 $\pm$ 0.7
CysSS	97.3 $\pm$ 2.5	98.5 $\pm$ 2.8	101.9 $\pm$ 4.0
Hcy	96.3 $\pm$ 2.7	96.8 $\pm$ 1.4	100.9 $\pm$ 3.6
HcySS	97.8 $\pm$ 10.3	95.3 $\pm$ 9.8	95.6 $\pm$ 8.5

Table 7 Concentrations of reduced and oxidized thiols in mouse serum with addition of derivatization reagent for preparation of serum

Analyte	Derivatization step	
	After*	Before**
GSH	Trace (4.1 $\pm$ 1.2)	241.7 $\pm$ 54.9
GSSG	103.9 $\pm$ 23.5	43.1 $\pm$ 16.7
Cys	16.0 $\pm$ 2.9	40.7 $\pm$ 6.0
CysSS	75.7 $\pm$ 11.1	53.8 $\pm$ 7.8
Hcy	N.D.	Trace (0.6 $\pm$ 0.2)
HcySS	1.0 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.2

( $\mu$ M)

\* Derivatization reagent was added after preparing serum sample.

\*\* Derivatization reagent was added before preparing serum sample.

N.D.: Not determined

Table 8 Intra- and inter-assay precision and accuracy for serum samples

Analyte	Added conc. ( $\mu$ M)	Intra-assay ( $n = 6$ )		Inter-assay ( $n = 9$ )	
		Precision (%RSD)	Accuracy (%)	Precision (%RSD)	Accuracy (%)
GSH	30	2.8	98.8	1.1	97.6
	50	3.2	97.5	2.4	96.7
	100	1.6	107.5	3.9	106.6
GSSG	30	2.9	107.4	1.7	105.5
	50	3.3	90.2	4.3	93.0
	100	1.5	90.2	4.0	93.2
Cys	30	3.9	99.3	0.4	99.0
	50	2.0	97.1	4.0	94.6
	100	1.5	102.8	3.1	100.3
CysSS	30	2.4	100.2	1.0	100.2
	50	2.5	97.9	3.7	93.6
	100	1.5	99.2	3.3	96.0
Hcy	3	1.6	92.7	0.7	93.3
	5	2.6	87.6	7.5	92.5
	10	2.3	93.7	2.4	96.4
HcySS	3	1.3	109.6	1.0	108.5
	5	2.6	95.1	9.2	101.7
	10	3.7	94.9	11.4	106.9

Table 9 Validation results of reduced and oxidized thiols

Analyte	Range	LOD*	LLOQ**	r	Matrix effect (%)		
	( $\mu$ M)				Low	Intermediate	High
GSH	10-500	0.10	10	0.9998	85.3 $\pm$ 3.9	66.2 $\pm$ 2.7	74.8 $\pm$ 2.3
GSSG	10-500	0.05	10	0.9999	89.0 $\pm$ 5.6	63.8 $\pm$ 3.6	57.2 $\pm$ 1.9
Cys	10-500	0.10	10	0.9999	76.3 $\pm$ 7.3	47.3 $\pm$ 2.0	48.8 $\pm$ 2.1
CysSS	10-500	0.05	10	0.9996	90.8 $\pm$ 4.5	64.9 $\pm$ 2.0	64.4 $\pm$ 2.7
Hcy	1-50	0.10	1	0.9998	91.0 $\pm$ 6.3	69.6 $\pm$ 3.3	84.1 $\pm$ 4.4
HcySS	1-50	0.05	1	0.9999	96.5 $\pm$ 5.5	65.5 $\pm$ 3.2	63.1 $\pm$ 3.9

\*LOD: S/N = 3

\*\*LLOQ: S/N > 10, precision and accuracy < 20%

#### 第 1-5-5 項 酸化および窒素化ストレス評価への応用

構築した分析法をマウス血清の分析に適用した結果、Figure 17 に示す通り、血清中の他の夾雑物と良好な相互分離が達成され、各化合物の定量が可能となった。

酸化ストレス評価のためにリポポリサッカライド (LPS) を投与したマウスの血清に適用し、血清中サイトカインとチオール化合物の動態解明を行った。LPS を投与 1 時間後の血清では炎症性サイトカインの一種である TNF- $\alpha$ 、IL-6 が上昇した。その後、IL-6 および INF- $\gamma$  の上昇がみられ、炎症が惹起されていることを確認した (Figure 18)。

同一の血清中チオール化合物濃度においては、LPS 投与 1 時間後に GSH の上昇が認められたが、GSSG および CysSS の濃度は減少した (Figure 19)。炎症性サイトカインは短時間で消失するのに対し、チオール化合物は長時間、濃度の変化が起こることが明らかとなった。この結果から、*in vivo* における酸化および窒素化ストレスを評価するバイオマーカーとして、チオール化合物が有用であることが推察された。

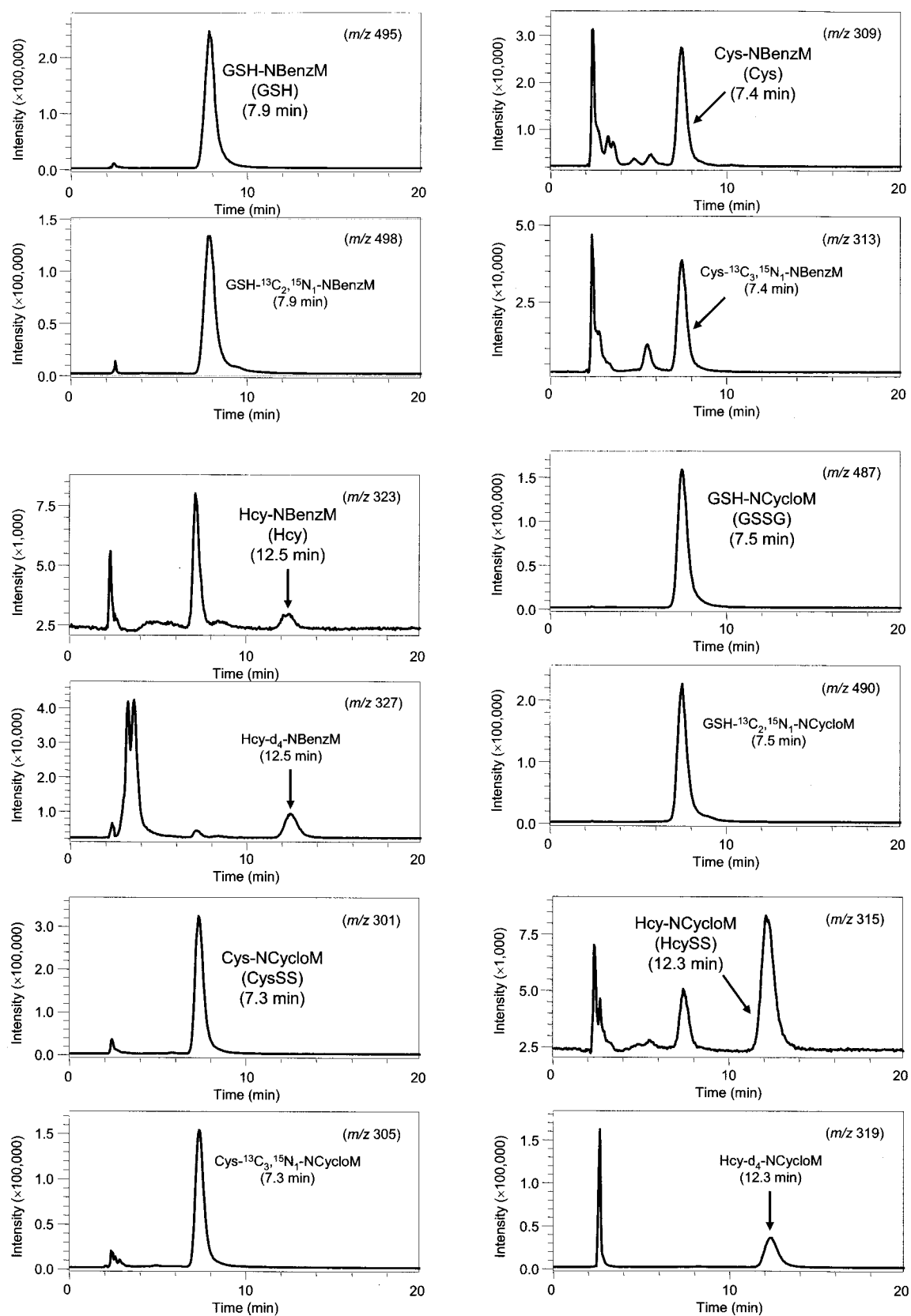


Figure 17 Typical chromatograms of reduced and oxidized thiols in mouse serum sample

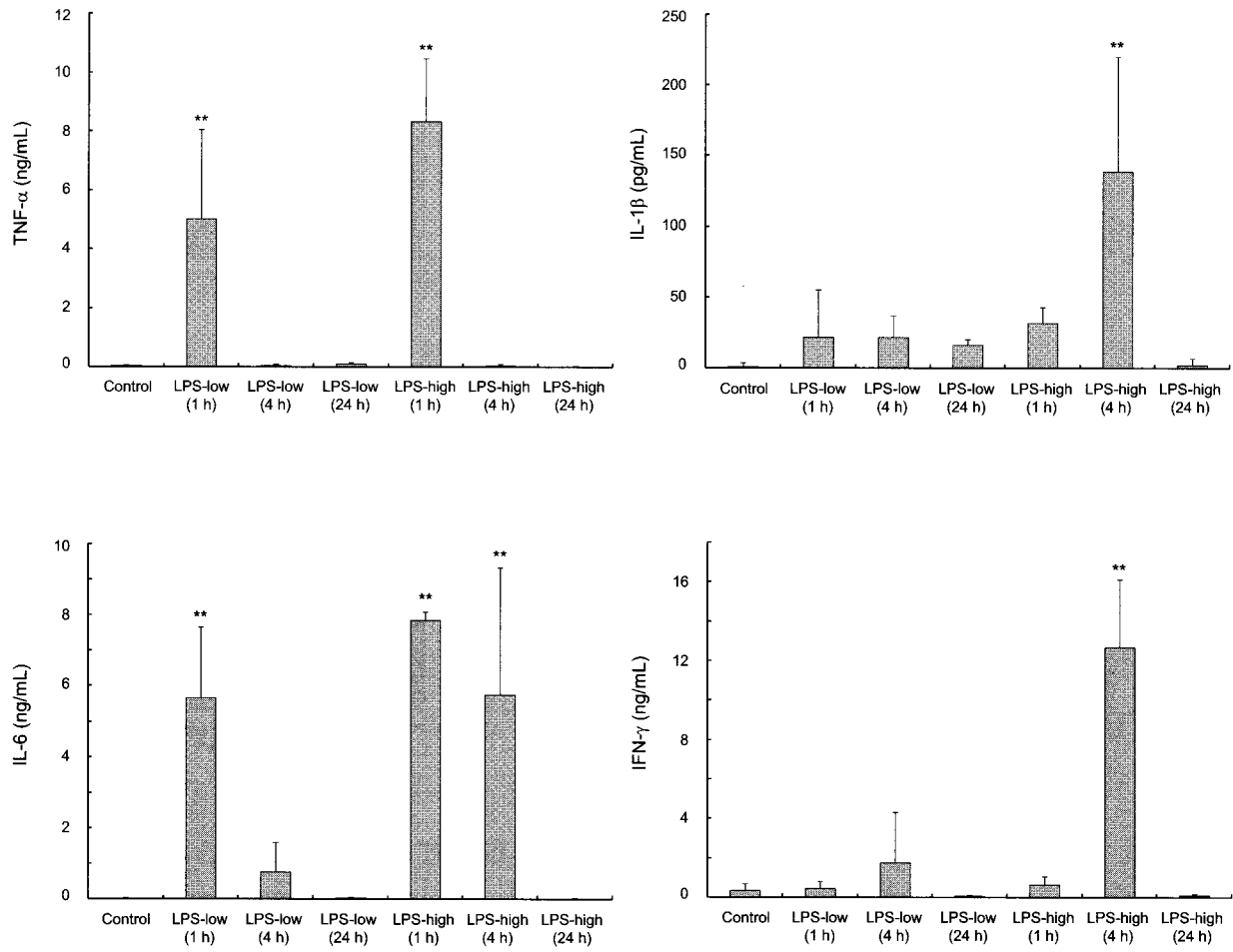


Figure 18 Proinflammatory cytokine levels in serum sampled from LPS-treated mice

Serum was collected of 1, 4 and 24 h after LPS treatment. Serum samples were subjected to cytokine measurements using ELISA kits. Data represent means  $\pm$  SD ( $n = 10$ ). \* and \*\*: statistically significant ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. control).

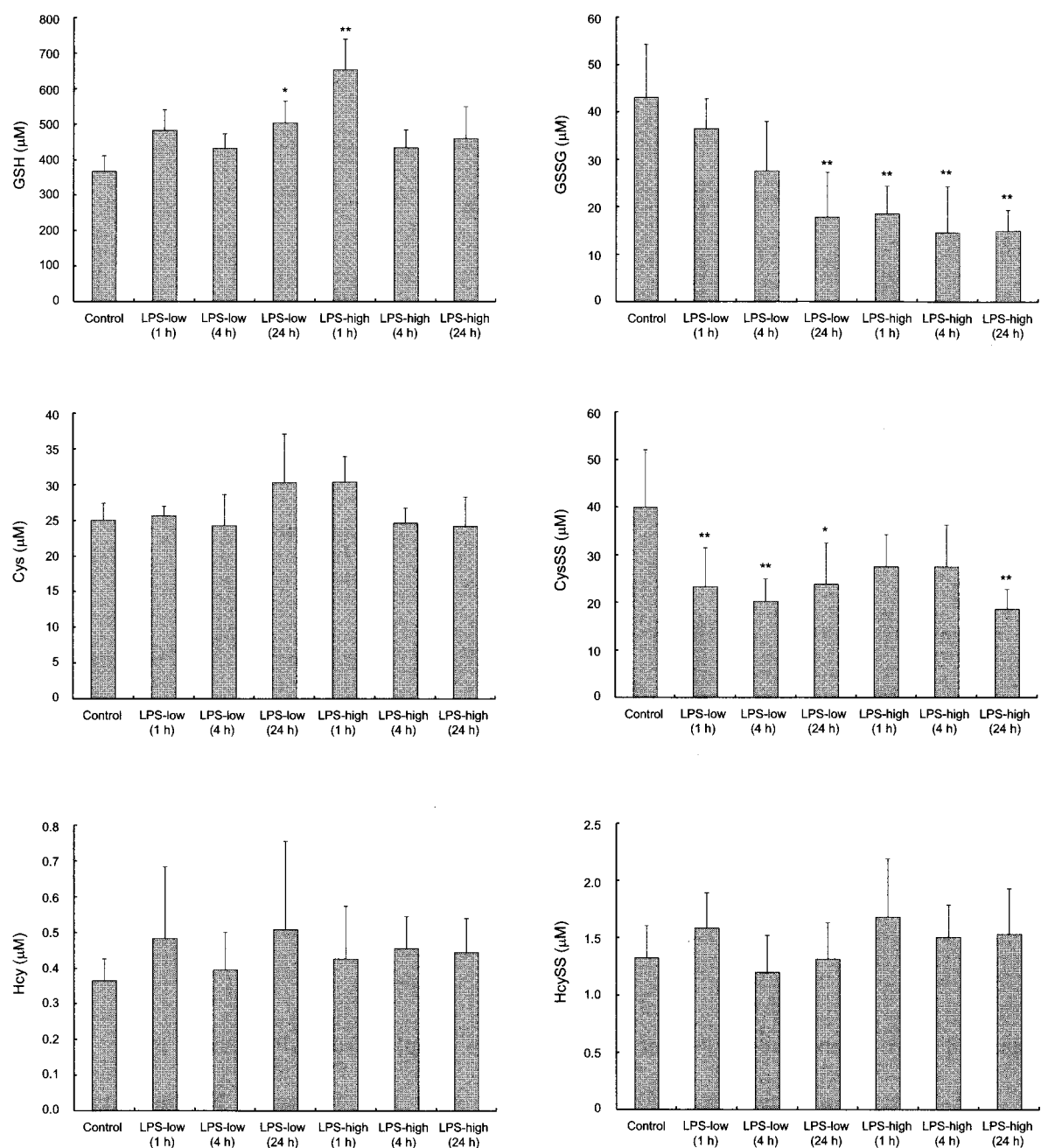


Figure 19 Levels of reduced and oxidized thiols in serum of LPS-treated mice

Serum was collected of 1, 4 and 24 h after LPS treatment. Serum samples were subjected to amino thiol measurements using column-switching hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry. Data represent means  $\pm$  SD ( $n = 10$ ). \* and \*\*: statistically significant ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. control).



本研究では、生体内の酸化物質と抗酸化物質に着目し、*in vitro*、*in vivo* で酸化および窒素化ストレス状態の評価が可能な高感度・選択的な生体内バイオマーカーを分析する手法を検討した。

ROS の代表物質として $\cdot\text{OH}$ について、ESR による検出法を検討した。その結果、ESR 測定に際し、スピントラッピングとして POBN を用いることで、妨害物質の影響を受けることなく、 $\cdot\text{OH}$  の測定が可能となった。

更に、ROS が DNA に及ぼす影響を評価するために、高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光光度検出/電気化学検出を用いて DNA の酸化指標である 8-OHdG の測定を試みた。その結果、ESR で得られた結果と 8-OHdG 生成量の間に良好な相関性が認められた。

ROS および RNS がタンパク質およびアミノ酸へ及ぼす影響を評価するため、高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出による分析法を構築した。各種蛍光誘導体化試薬を検討した結果、NBD-F により誘導体化を行うことによって、全ての測定対象物質が発蛍光性を有するようになり、蛍光検出器による高感度・選択的な分析法が可能となった。

生体内抗酸化物質としては、反応性の高いチオール化合物を測定対象物質として選定し、カラムスイッチング-HILIC/MS による血清中チオール化合物分析法を検討した。検出器として高感度・選択的な検出ができる MS を使用したことで、生体試料に存在するチオール化合物を精度よく定量することができた。測定に供する試料量は極少量 (25  $\mu\text{L}$ ) で測定が可能となり、高感度・高精度な分析法が達成できたことから、マウスの血清からチオール化合物を定量することが可能となった。

## 第 2 章 食品中の化学物質の複合反応による活性酸素種および活性窒素種の生成

### 第 2-1 節 序論

ROS および RNS は疾患<sup>54,55)</sup>、喫煙<sup>56)</sup>、紫外線<sup>57)</sup>など特定の外的因子によって產生されることが知られている。しかし、一般的な生活環境下において、ROS および RNS が產生されるか否かについては十分に解明されていない。

近年、野菜、果物など食品中に含有されるフェノール性化合物の抗酸化能が注目されており、健康食品などにフェノール性化合物が幅広く使用されている<sup>58)</sup>。この理由として、フェノール性化合物は抗がん作用など、さまざまな生理活性を有することが報告<sup>59,60)</sup>されており、これら化合物を摂取することは体にとってよいものと認識されているからである。このことを受け、米国の NCI（国立がん研究所）、PBH（農作物健康増進基金）および CDC（疾病予防管理センター）は、野菜や果物を 1 日 5 種類以上摂取することを目標とする「5 A day」を提唱している<sup>61)</sup>。

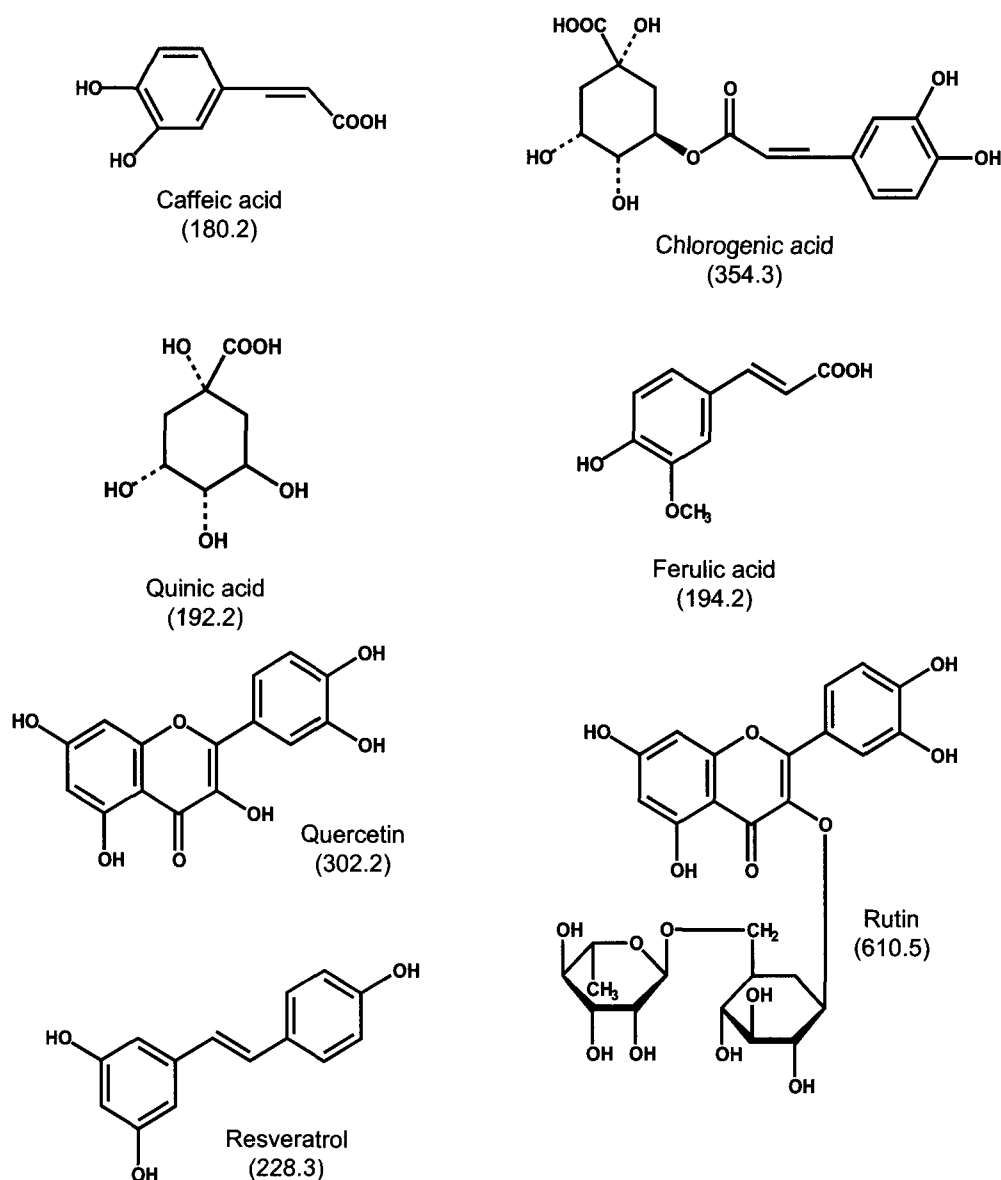
食品中にはさまざまな化学物質が含まれており、一度の食事で多種多様の食品や飲料を摂取することで、これらの化学物質が体内で複合的に反応し、生体に影響を与えると考えられる。そのため、個別では安全と謳われていた食品中の化学物質でも相互的な複合影響を解明する必要がある。

そこで第 2 章では、生活習慣が ROS および RNS の生成に関わる要因として、食品中の化学物質の複合反応に着目し、第 1 章で構築した方法を用いて *in vitro* における ROS および RNS の産生量について評価した。

## 第 2-2 節 フェノール性化合物と金属の併用が活性酸素種生成に及ぼす影響

ROS は動脈硬化、心疾患、老化や発がんといった種々の疾病に関与していることが明らかとなっており、ROS を消去するフェノール性化合物の摂取はこれら疾病の予防につながると考えられている。中でも、茶葉に含まれるカテキン類やコーヒーなどに多く含まれるクロロゲン酸 (ChA) およびカフェイン酸 (CaA) に代表されるフェノール性化合物は抗酸化作用を有することから、摂取することが推奨されている。しかし、フェノール性化合物と金属が反応することで ROS が産生することが報告<sup>62-64)</sup>されており、フェノール性化合物の安全性について詳細な研究が要求されている。

本研究では、食品に含有されるフェノール性化合物 (Figure 1) と金属の併用が ROS の産生に及ぼす影響について評価した。



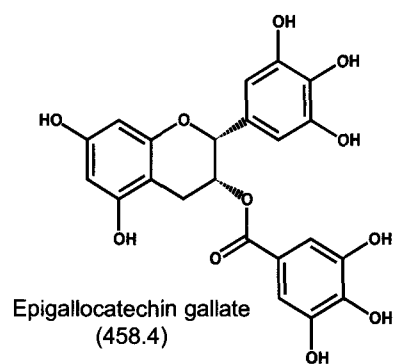
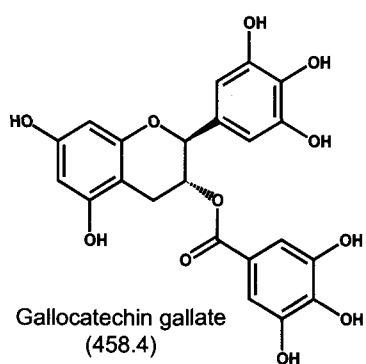
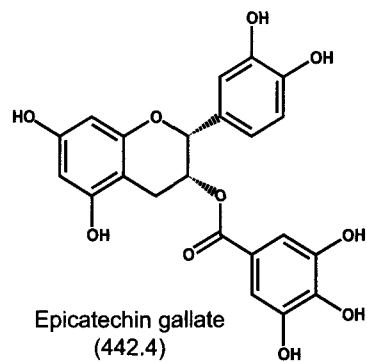
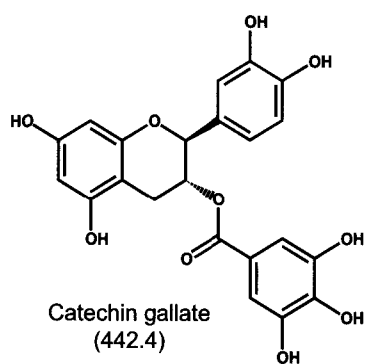
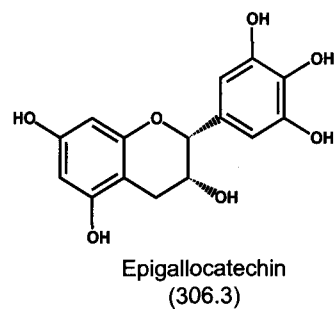
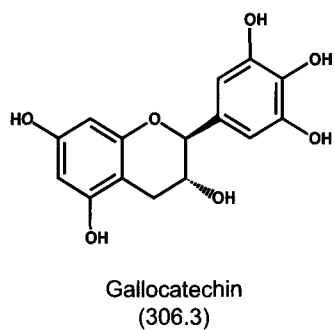
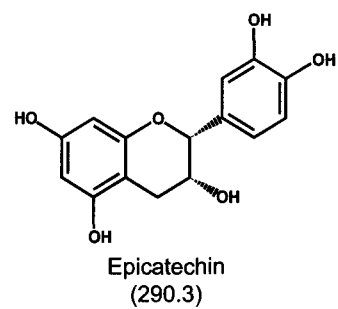
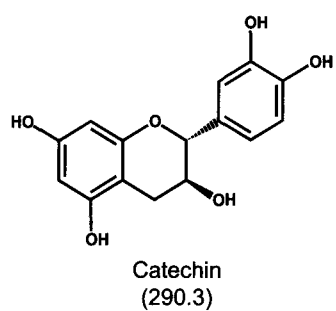


Figure 1 Chemical structures of polyphenol compounds in food

## 第 2-2-1 項 吸光光度法による Antioxidant 作用の評価

Antioxidant 作用の評価は、一般的にラジカルの消去を指標とする。実際、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$  の消去を指標として Antioxidant 作用を評価した報告<sup>65)</sup>がなされている。その中でも、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) を用いた測定は汎用性の高い方法として認知されている。この方法は、比較的安定な有機ラジカルである DPPH ラジカルが抗酸化物質と反応し消去されると、可視部の吸光度が低下する特徴を利用して Antioxidant 作用を直接的に評価するものである。

本研究では、Szydlowska-Czerniak らの方法<sup>66)</sup>を参照に、各種フェノール性化合物の ROS の消去力を、DPPH ラジカルを用い、マイクロウェルプレートにて吸光度を測定することで評価した。その結果、Figure 2 に示すように、キナ酸 (QA) を除いたフェノール性化合物 14 種類で、DPPH ラジカルの消去が認められ、Antioxidant 作用を有することが証明された。また、化合物によって DPPH ラジカルの消去力に差が生じたため、その化学構造を比較することで、Antioxidant 作用の強さを考察した。フェノール性水酸基がメタ位にあるレスベラトロール (Res) やフェノール性水酸基が少ないフェルラ酸 (FA) や QA では消去力が弱く、逆にオルト位にあるものやピロカテコール骨格を有するものは、消去力が強いことが示唆された。またカテキン類でも、カテキンガレート、エピカテキンガレートに代表されるように、構造内にガレート基を有する化合物はラジカルを補足する能力が高く、カテコール基 (1,2-dihydroxybenzene) よりピロガロール基 (benzene-1,2,3-triol) を構造内に有する方が、抗酸化力が上昇していることが明らかとなった。フェノール性化合物の抗酸化作用のメカニズムは、発生した $\cdot\text{OH}$ などのラジカルを直接補足することと、溶液内に微量に存在する金属とキレートを形成して、フェントン反応を阻害する二種類に分類される<sup>60)</sup>。本反応系は、金属の影響が無いものと考えられることから、構造内にガレート基やピロガロール基を有する化合物はラジカルを直接補足する能力が高いことが考えられた。

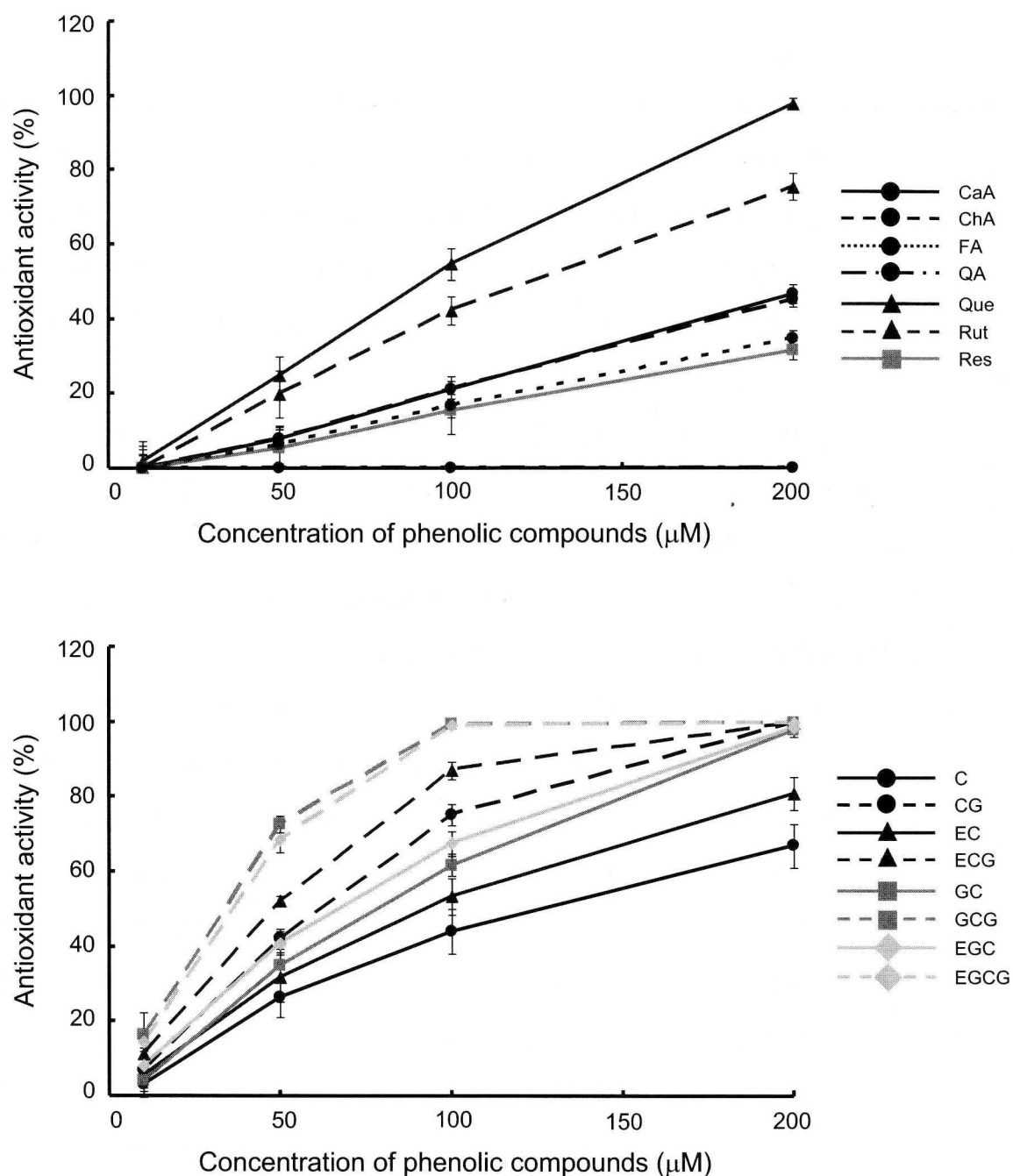


Figure 2 Antioxidant activities of phenolic compounds as assessed by DPPH assay  
DPPH concentration was 1 mM. Data points represent means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).  
CaA, caffeic acid; ChA, chlorogenic acid; FA, ferulic acid; QA, quinic acid;  
Que, quercetin; Res, resveratrol; C, catechin; CG, catechin gallate;  
EC, epicatechin; ECG, epicatechin gallate; GC, gallocatechin;  
GCG, gallocatechin gallate; EGC, epigallocatechin; EGCG, epigallocatechin gallate.

## 第 2-2-2 項 電子スピン共鳴法による Prooxidant 作用の評価

ROS 生成を評価する方法として、現在までにさまざまな方法がある。その中でも ESR を用いた方法はラジカルを直接測定できることから、信頼性の高い方法と考えられる。第 1-2 節で構築した方法を用い、Prooxidant 作用を測定したところ、フェノール性化合物と銅の反応はその比率が 2:1 で反応させた時に $\cdot\text{OH}$ の生成量が最も大きくなり、フェノール性化合物の濃度が増えるに従って、 $\cdot\text{OH}$ の生成量も減弱した (Figure 3)。また、FA、QA、Res を除いた 12 種類のフェノール性化合物は 2 価の銅と反応することで $\cdot\text{OH}$ の発生が認められた (Figure 4)。また、ガレート基を有する化合物は Prooxidant 作用が減少した。

フェノール性化合物と銅の反応経路を考察するために、各種キレート化合物、抗酸化系酵素を併用し、Prooxidant 作用を測定したところ、 $\cdot\text{OH}$ の生成が減少した。これらの結果から、反応系には金属が関与することで、ROS が産生されていることが示唆された (Figure 5)。

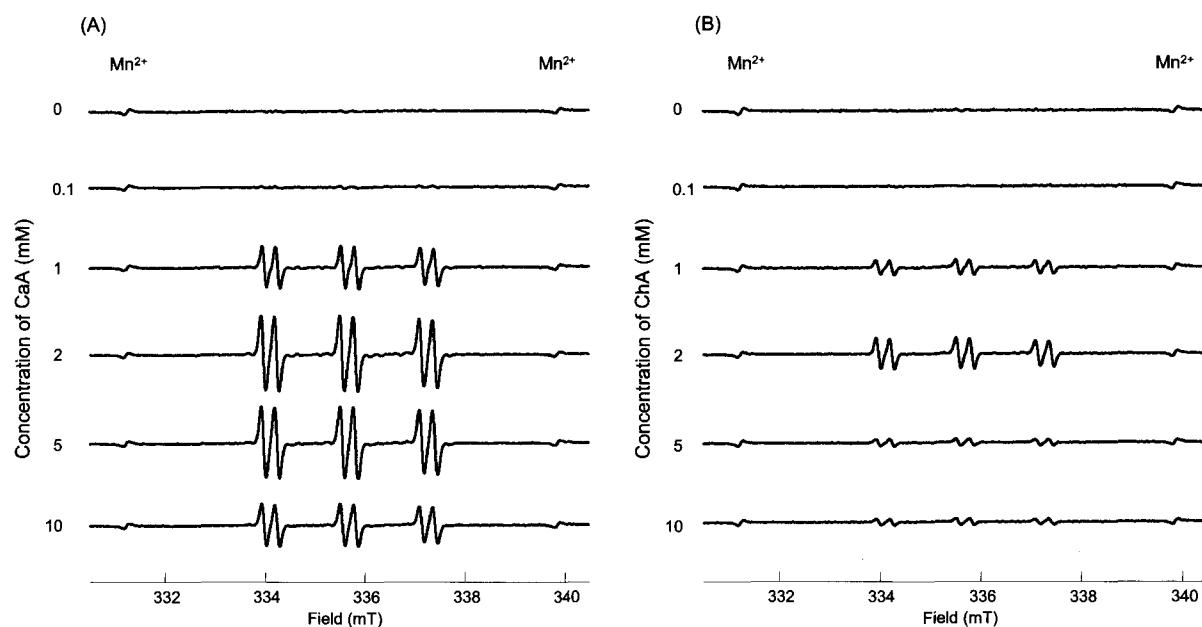


Figure 3 Representative ESR spectra of the interaction between CaA (A) or ChA (B) and copper

The reaction mixture consisted of copper (1 mM), phenolic compound, DMSO (10%) and POBN (10 mM) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4), and the ESR spectra were recorded after reacting for 30 min at 37°C.



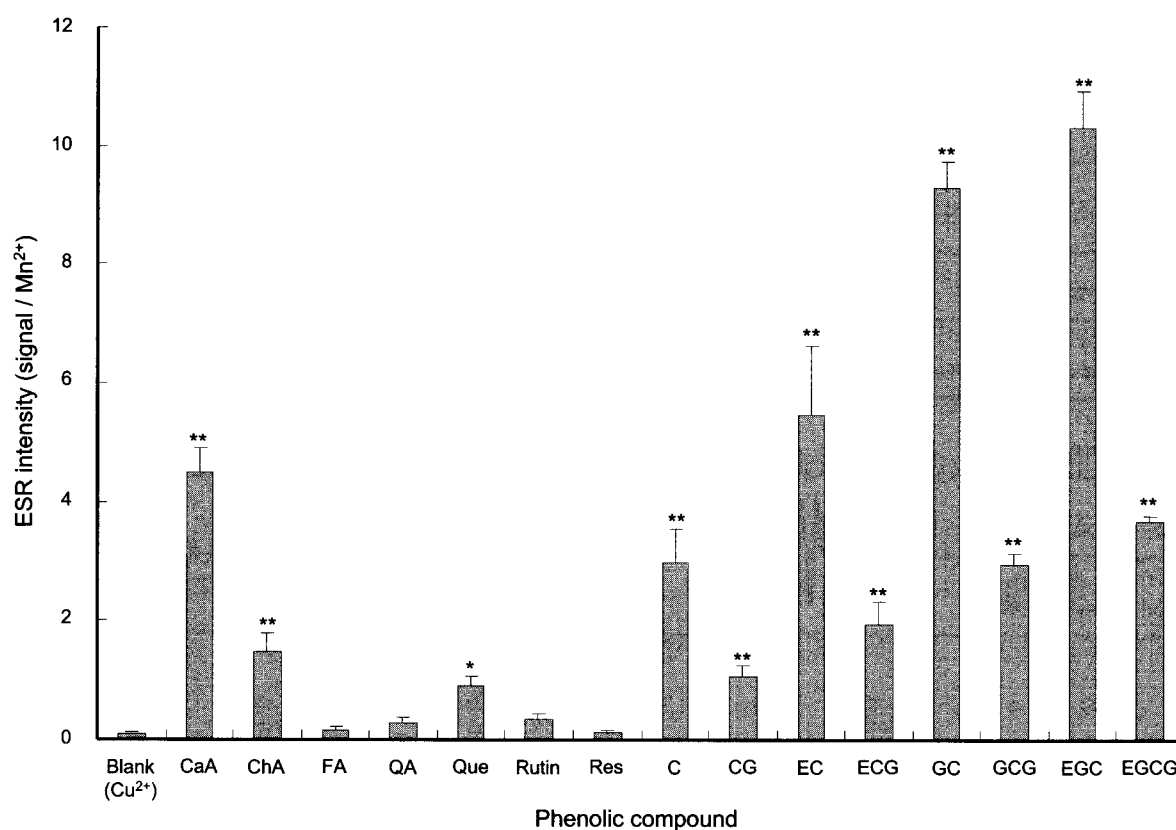


Figure 4 Prooxidant activities in interaction between phenolic compounds and copper

The concentration of each phenolic compound was 2 mM, and copper concentration was 1 mM. Data points represent means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). \* and \*\* : statistically significant vs. blank ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  by ANOVA).

CaA, caffeic acid; ChA, chlorogenic acid; FA, ferulic acid; QA, quinic acid;

Que, quercetin; Res, resveratrol; C, catechin; CG, catechin gallate;

EC, epicatechin; ECG, epicatechin gallate; GC, galocatechin;

GCG, galocatechin gallate; EGC, epigallocatechin; EGCG, epigallocatechin gallate.

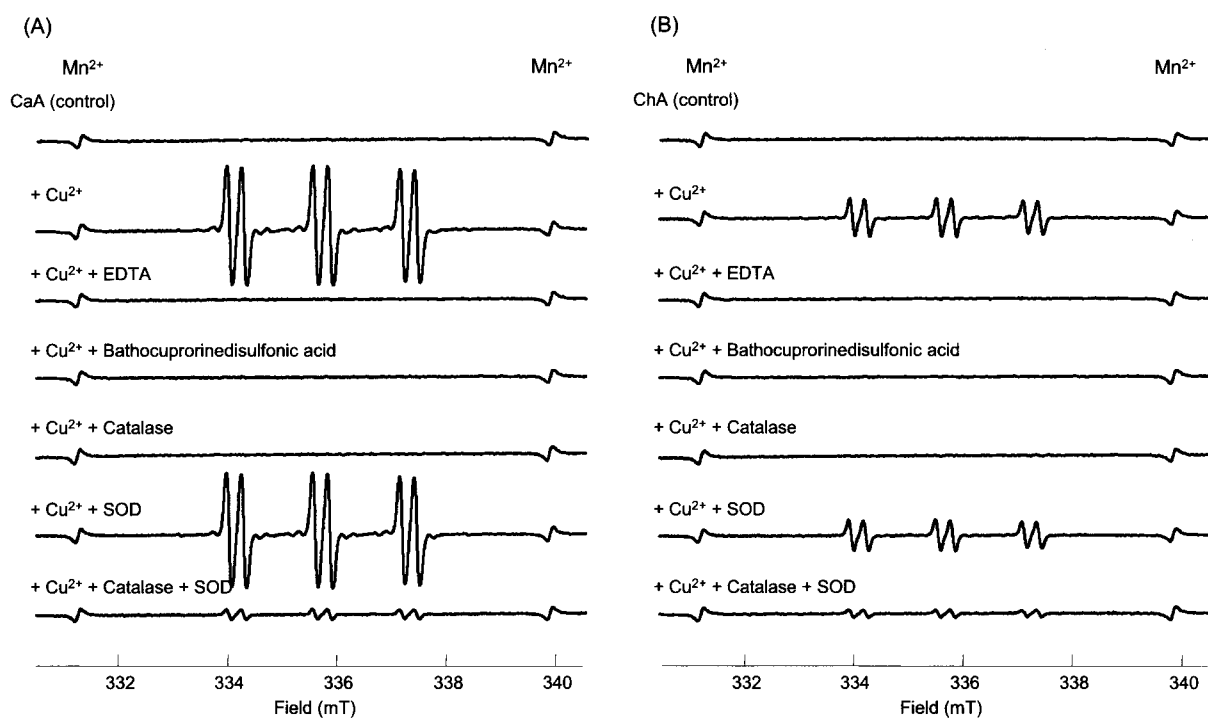


Figure 5 Effect of chelator and antioxidant enzyme on ROS generation

The reaction mixture consisted of copper (1 mM), CaA (A) or ChA (B) (2 mM), DMSO (10%) and POBN (10 mM) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4), and the ESR spectra were recorded after reacting for 30 min at 37°C.

### 第 2-2-3 項 DNA 損傷の評価のための 8-OHdG の測定

ROS による酸化ストレスの増大は核酸の酸化を惹起し、老化や発がんなど各種疾患と関連することが示唆されている。第 1-3 節で示した通り、8-OHdG は dG の 8 位が ROS によって酸化されて生じる酸化物であり、酸化ストレスの評価として、有用なバイオマーカーである。

第 2-2-2 項でフェノール性化合物と銅が反応することで $\cdot\text{OH}$ の生成が認められたことから、生体への影響を検討するため、DNA 酸化の指標である 8-OHdG の測定を試みた。その結果、ESR で得られた結果と同様に、FA、QA および Res を除いたフェノール性化合物と銅を併用することで、8-OHdG 量の増加が認められた (Figure 6)。ROS はオルト位にフェノール性水酸基が配位している化合物と銅の反応によって生成されることが報告<sup>62-64)</sup>されている。そのため、FA、QA および Res はオルト位に水酸基を持たないことから ROS が生成されなかったことが推察された。更に、これらの結果から、ESR を用いた $\cdot\text{OH}$ の測定法は、HPLC/UV/ECD と相補的な方法として利用できることが明らかとなった。

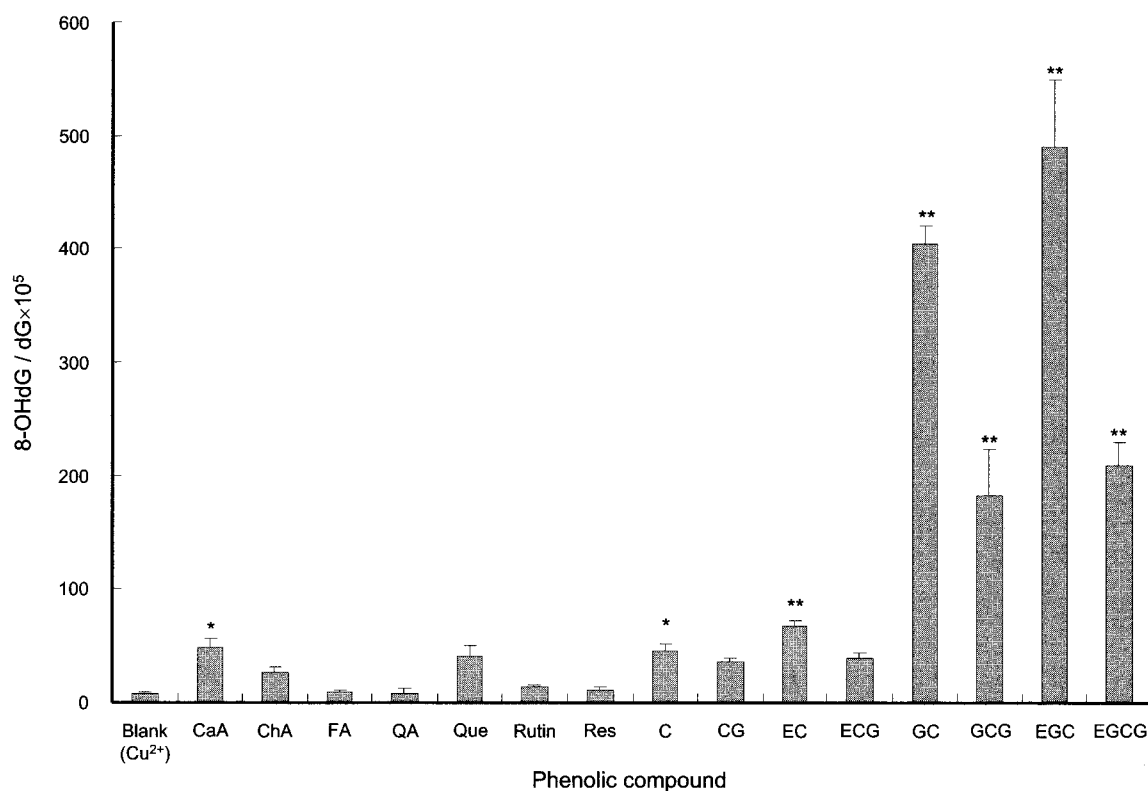


Figure 6 Formation of 8-OHdG between with reaction various phenolic compounds and copper. The concentration of each phenolic compound was 0.2 mM and copper concentration was 0.1 mM. Data points represent means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). \* and \*\* : statistically significant vs. blank ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  by ANOVA).

CaA, caffeic acid; ChA, chlorogenic acid; FA, ferulic acid; QA, quinic acid; Que, quercetin; Res, resveratrol; C, catechin; CG, catechin gallate; EC, epicatechin; ECG, epicatechin gallate; GC, gallic catechin; GCG, gallic catechin gallate; EGC, epigallocatechin; EGCG, epigallocatechin gallate.

## 第 2-3 節 フェノール性化合物と亜硝酸ナトリウムの併用が活性酸素種および 活性窒素種の生成に及ぼす影響

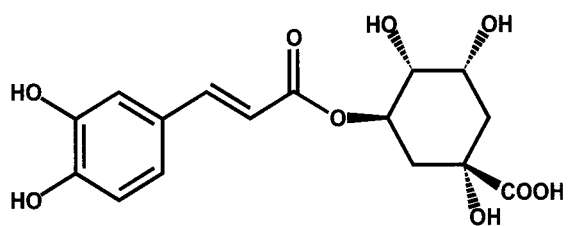
ROS は動脈硬化、心疾患や発がんといった種々の疾病に関与していることが明らかとなっている。一方、ROS を消去する抗酸化物質の摂取はこれら疾病の予防につながると考えられている。中でも、茶葉に含まれるカテキン類や、コーヒーに多く含まれる ChA および CaA などのフェノール性化合物は抗酸化作用を有する<sup>59,60)</sup>ことから、近年、予防医学の観点で注目されている。しかし、フェノール性化合物と金属が反応することで ROS が発生することが第 2-2 節で示されており、抗酸化物質の安全性については更なる研究が要求されている。

他方、食品添加物の発色剤として食肉や魚などに幅広く使用されている亜硝酸ナトリウム (NaNO<sub>2</sub>) はカテコールと併用することにより、ラットの前胃で発がんを生じることが知られている<sup>67)</sup>。更に、NaNO<sub>2</sub> は胃酸酸性条件下でフェノール性化合物と反応してニトロ化反応を引き起こすことが考えられる。しかし、新たに生成されたニトロ化合物が ROS および RNS 産生に及ぼす影響については評価されていない。

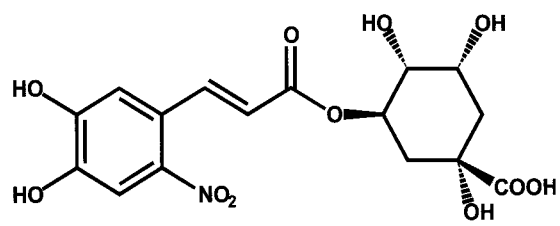
本研究では、ChA および CaA と NaNO<sub>2</sub> を併用することにより生成されるニトロ化合物が、ROS および RNS の生成に関与しているかに否かについて *in vitro* で検証した。

### 第 2-3-1 項 ニトロ化合物の合成

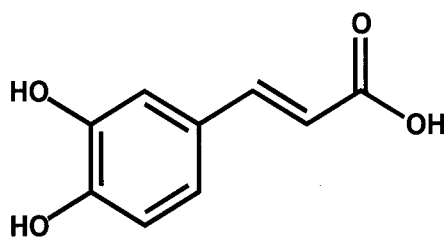
フェノール性化合物のニトロ化体の標準品が市販されていないことから標準品を確保するためにニトロ化合物の合成を試みた。得られた化合物を LC/MS および NMR で確認したところ、CaA がニトロ化反応を受けて 6,7-dihydroxy-1,2-(4*H*)-benzoxazin-4-one (CaA-NO-1)、2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxoethanaloxime (CaA-NO-2)、2-oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2,5-oxadiazole (CaA-NO-3) が生成されたことを確認した (Figure 7)。また、得られた標準品を用い、LC/UV による測定を行ったところ、他の夾雑物が認められない良好なクロマトグラムを得ることができた (Figure 8)。



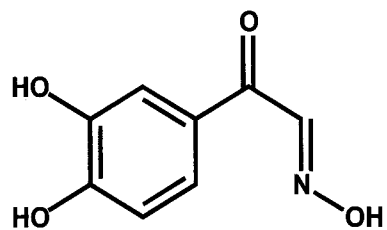
Chlorogenic acid (ChA)



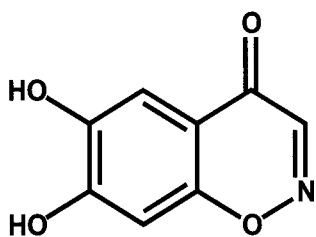
Nitrochlorogenic acid  
(ChA-NO)



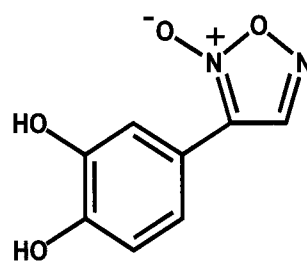
Caffeic acid (CaA)



2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-oxoethanaloxime  
(CaA-NO-1)



6,7-Dihydroxy-1,2-(4*H*)-benzoxazin-4-one  
(CaA-NO-2)



2-Oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2,5-oxadiazole  
(CaA-NO-3)

Figure 7 Structures of ChA, CaA, and their nitrated phenolic compounds

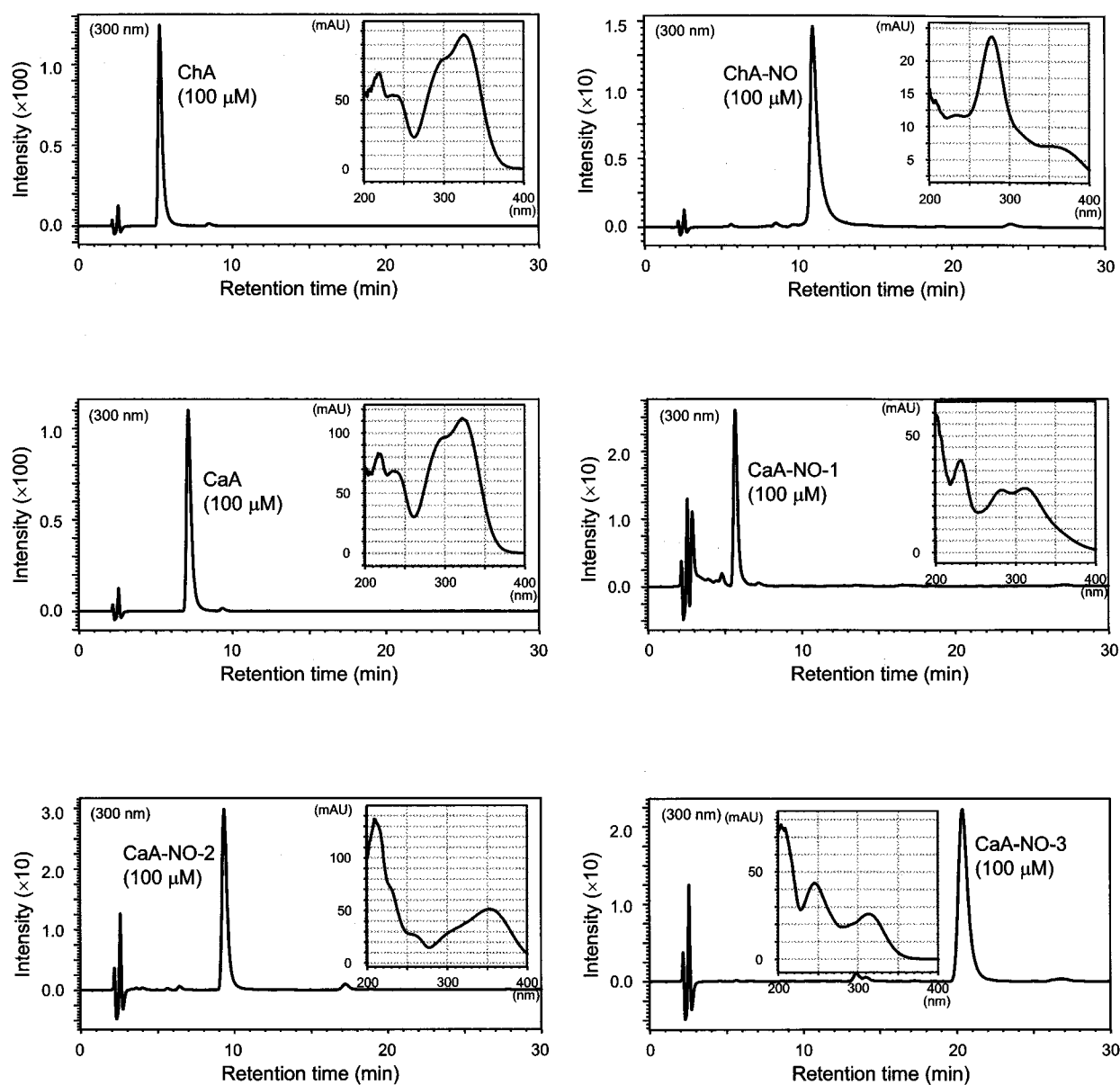


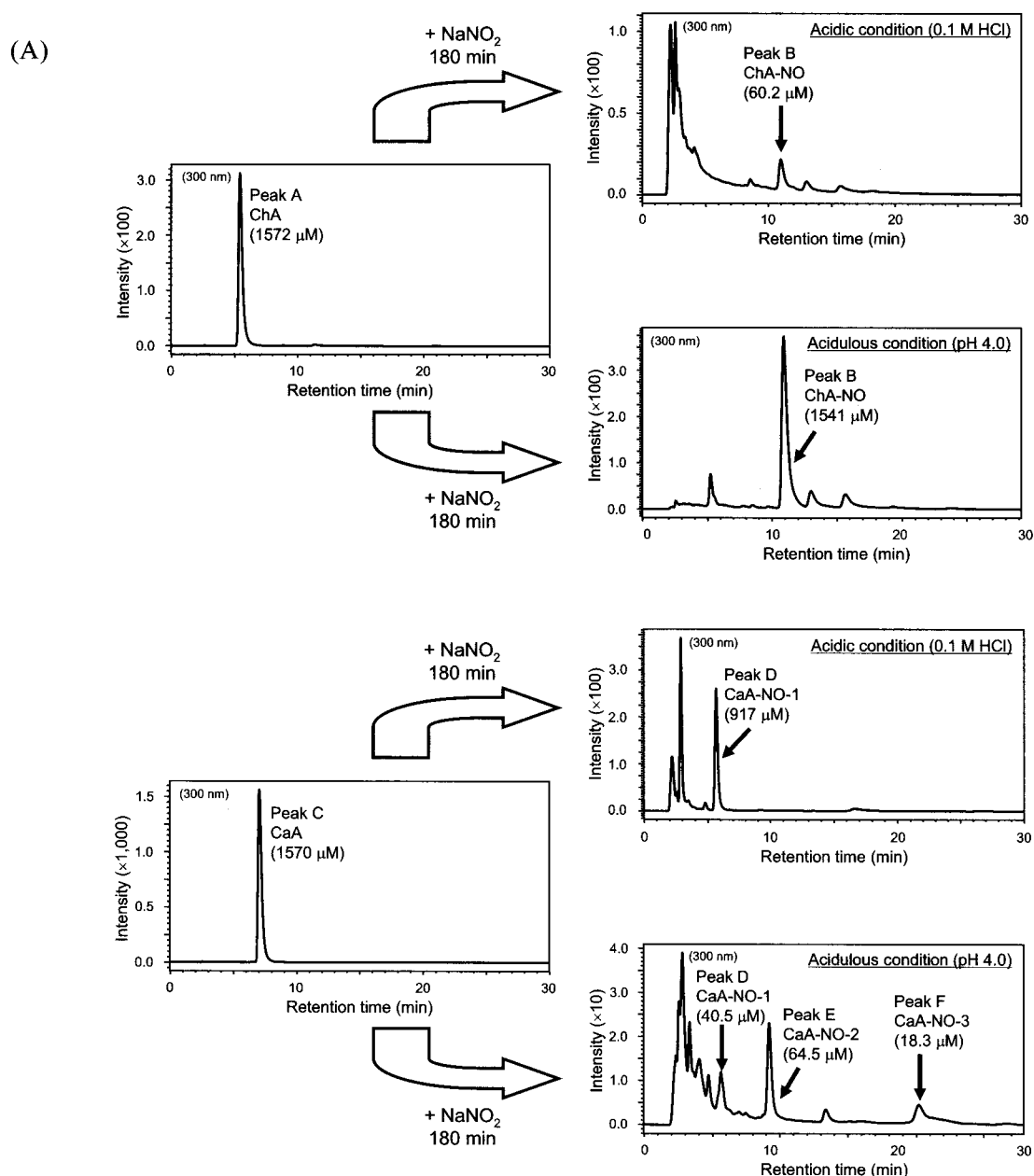
Figure 8 UV chromatograms and spectra of ChA, CaA and nitrated phenolic compounds

Separation of the analytes was accomplished on an XBridge C18 column (3.5 μm, 2.1 × 150 mm; Waters, Japan). Mobile phase was 0.1% aqueous formic acid and 0.1% formic acid in acetonitrile (90:10, v/v).

## 第 2-3-2 項 *in vitro* における試薬の安定性評価

反応液の液性の pH がニトロ化合物の生成に与える影響を調べるために、人工胃液中 (0.1 M HCl) および 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) で反応を行った。その結果、反応における溶媒の pH によって生成する化合物および濃度が変化することが分かった (Figure 9)。

また、生体内における各々の化合物の安定性試験を行うために、人工胃液および PBS 中で反応を行い、経時的に測定を行った。その結果、全てのフェノール性化合物は人工胃液条件下において、安定に存在することが確認された。しかし、中性条件下においては、CaA-NO-2 および CaA-NO-3 の顕著な分解が確認された (Figure 10)。





(B)

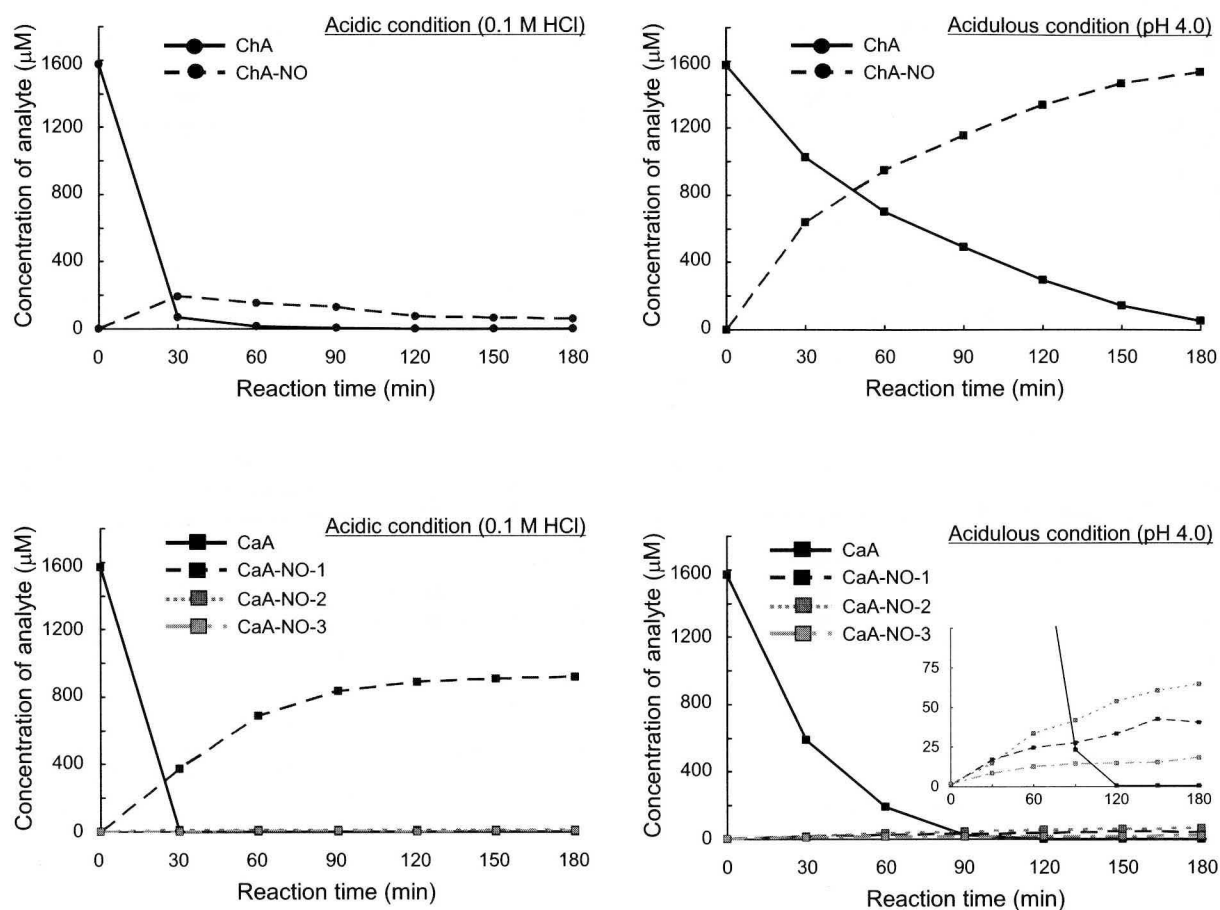


Figure 9 Reaction between phenolic compound and sodium nitrate under acidic condition

(A) UV chromatograms of the reaction between phenolic compound and sodium nitrate. (B) Time course of generated compounds under the acidic or acidulous condition.

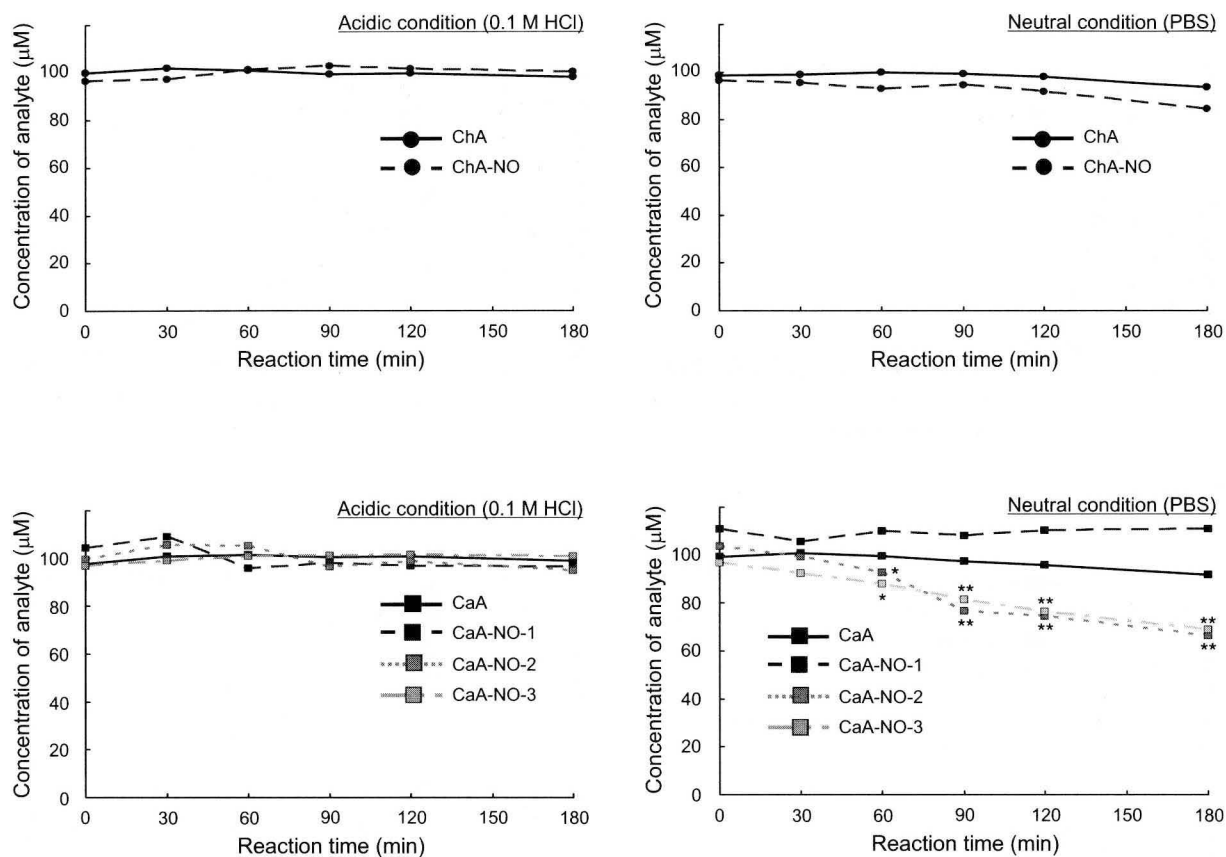


Figure 10 Sample stability of phenolic and nitrated phenolic compounds under acidic and neutral conditions

\* and \*\*: statistically significant ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. 0 min).

### 第 2-3-3 項 吸光光度法による Antioxidant 作用の評価

DPPH を用いた方法は簡便な Antioxidant 作用の分析法であり、現在でも汎用性の高い方法として使用されている。この方法は、比較的安定な有機ラジカルである DPPH ラジカルが抗酸化物質と反応して消去されると、可視部の吸光度が低下する特徴を利用するもので、Antioxidant 作用を直接的に評価することができる。本研究では、この吸光光度法を使用してフェノール性化合物およびニトロ化されたフェノール性化合物の Antioxidant 作用の評価を試みた。その結果、フェノール性化合物はニトロ化を受けることで Antioxidant 作用が増強する結果が得られた (Figure 11)。

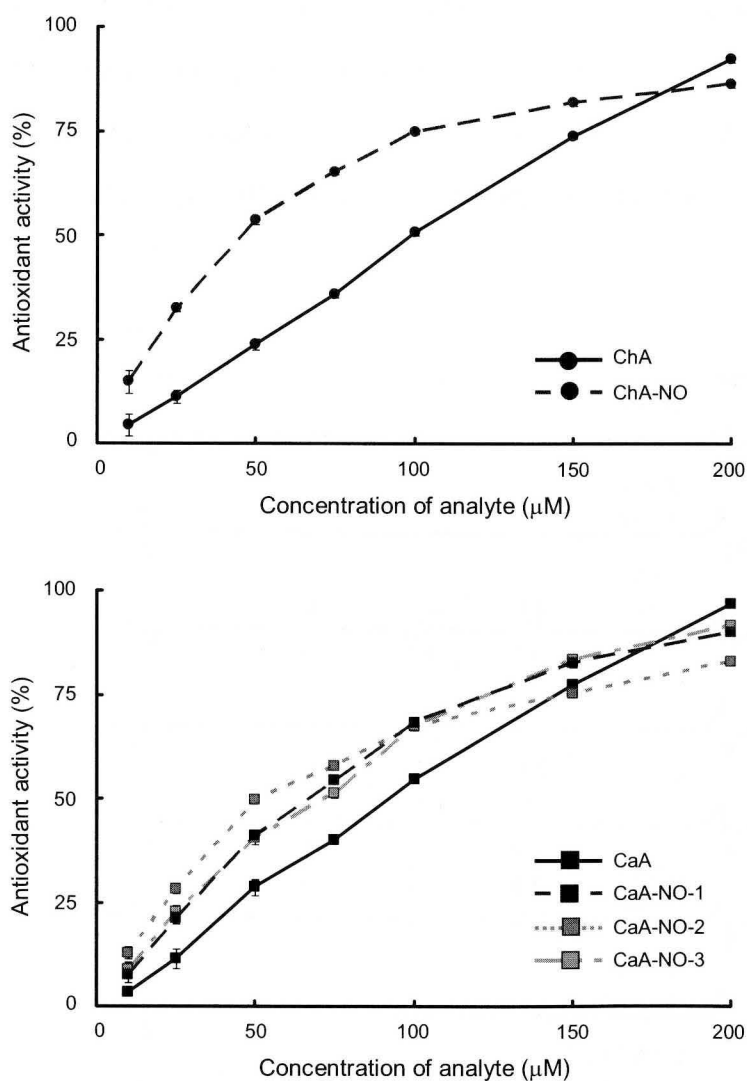
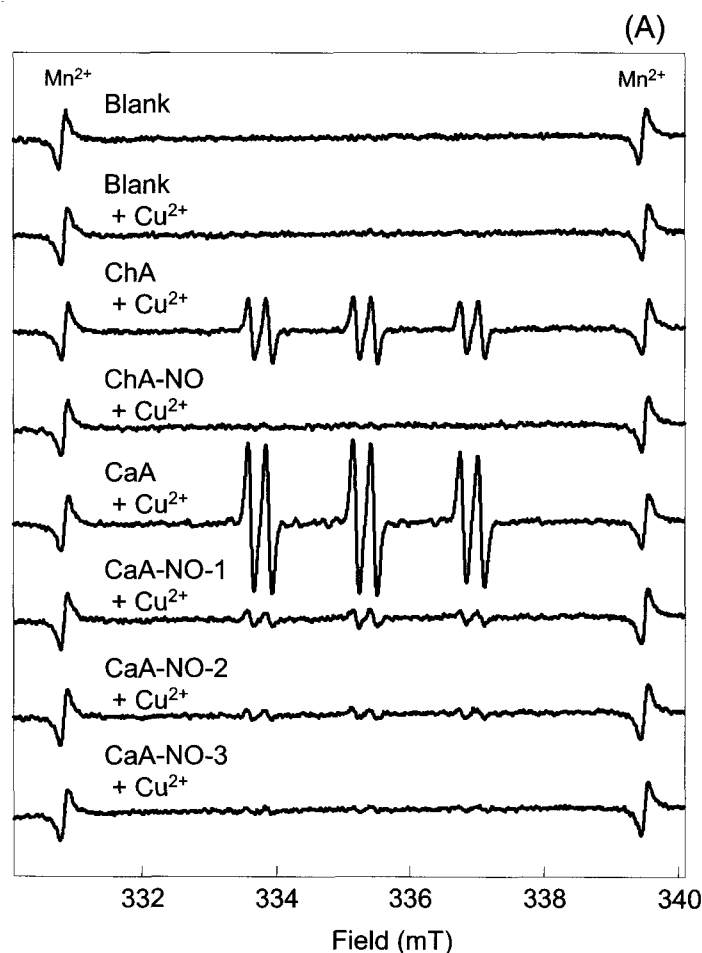


Figure 11 Antioxidant activities of phenolic compounds as assessed by DPPH assay  
DPPH concentration was 1 mM. Data points represent means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ).

第 2-3-4 項 電子スピン共鳴法および高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光光度検出/  
電気化学検出による Prooxidant 作用の評価

Antioxidant 作用を有するフェノール性化合物が金属と反応して、ROS が産生されることを第 2-2-2 項で示した。そこで、ニトロ化を受けたフェノール性化合物も同様に Prooxidant 作用を示す可能性があったため、ESR による測定を試みた。スピントラッピング剤に POBN を用い、フェノール性化合物 (CaA、CaA-NO-1~3、ChA および ChA-NO) と銅と反応させたところ、 $\cdot\text{OH}$  の生成を確認した。また、ニトロ化反応を受けることで  $\cdot\text{OH}$  の生成量が減少する結果が得られた (Figure 12A)。

ESR で検出された ROS 生成について生体内でも同様の結果が得られるかを評価するために、DNA 酸化の指標である 8-OHdG の測定を試みた。その結果、ESR で得られた結果と同様に、フェノール性化合物と銅を併用することで、8-OHdG 量の増加が認められ、ニトロ化反応を受けることで 8-OHdG 量が減少した (Figure 12B および 12C)。



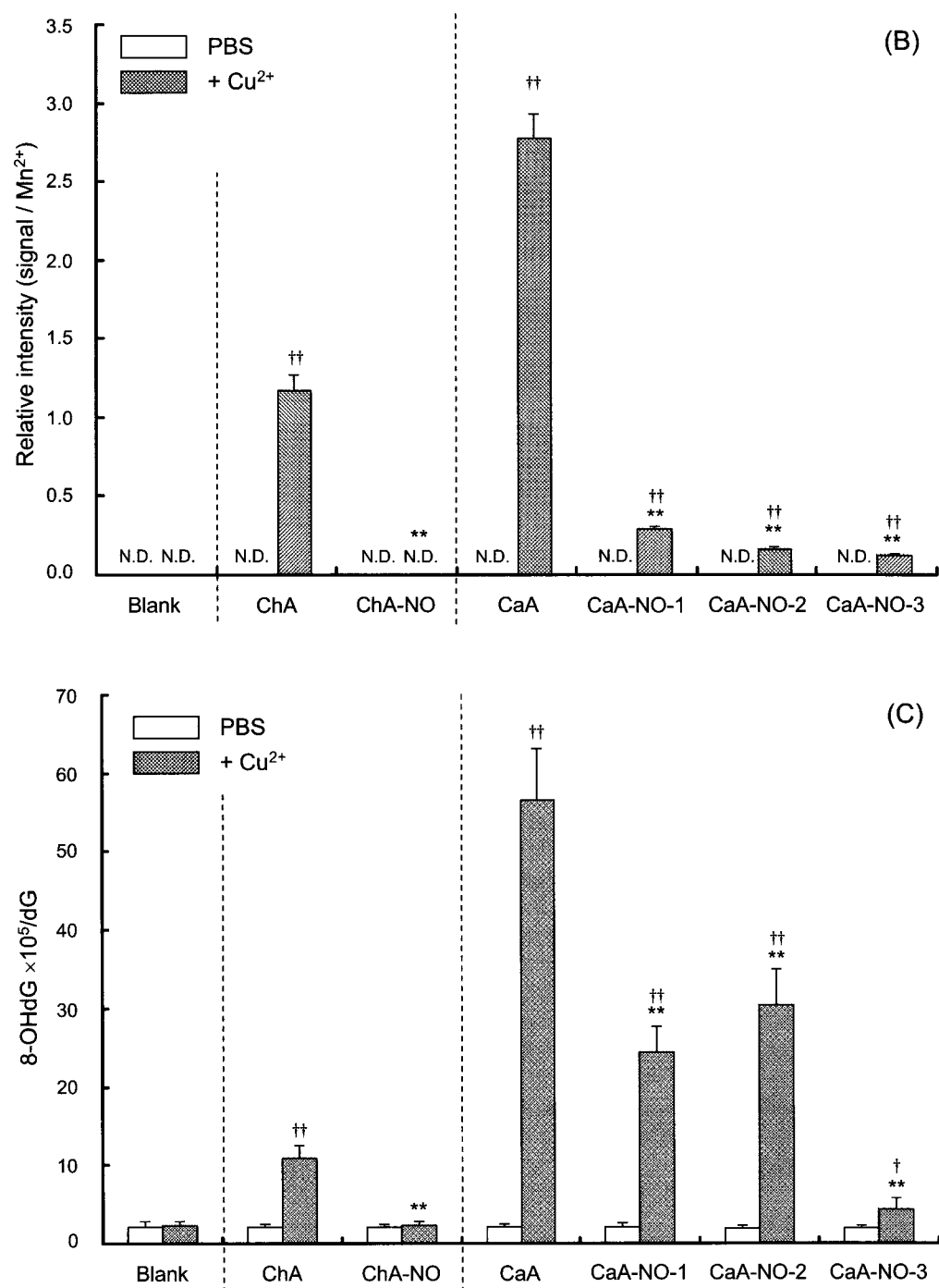


Figure 12 Prooxidant activities produced by the reaction between phenolic compounds and copper

Data represent means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). \* and \*\*: statistically significant ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. phenolic compound + copper). † and ††: statistically significant ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. phenolic compound alone). (A) Representative ESR spectra of the interaction between ChA, CaA, or nitrated phenolic compounds and copper. (B) ESR. (C) HPLC/UV/ECD.

### 第 2-3-5 項 Griess 法による活性窒素種の測定

ChA、CaA およびニトロ化されたフェノール性化合物について、RNS 発生能を Griess 法<sup>68,69)</sup>によって評価した。その結果、全ての化合物について、人工胃液中では  $\text{NO}_2^-$  の産生が認められなかった。しかし、中性条件下では CaA-NO-3 について、 $\text{NO}_2^-$  の産生が経時的に認められた (Figure 13)。

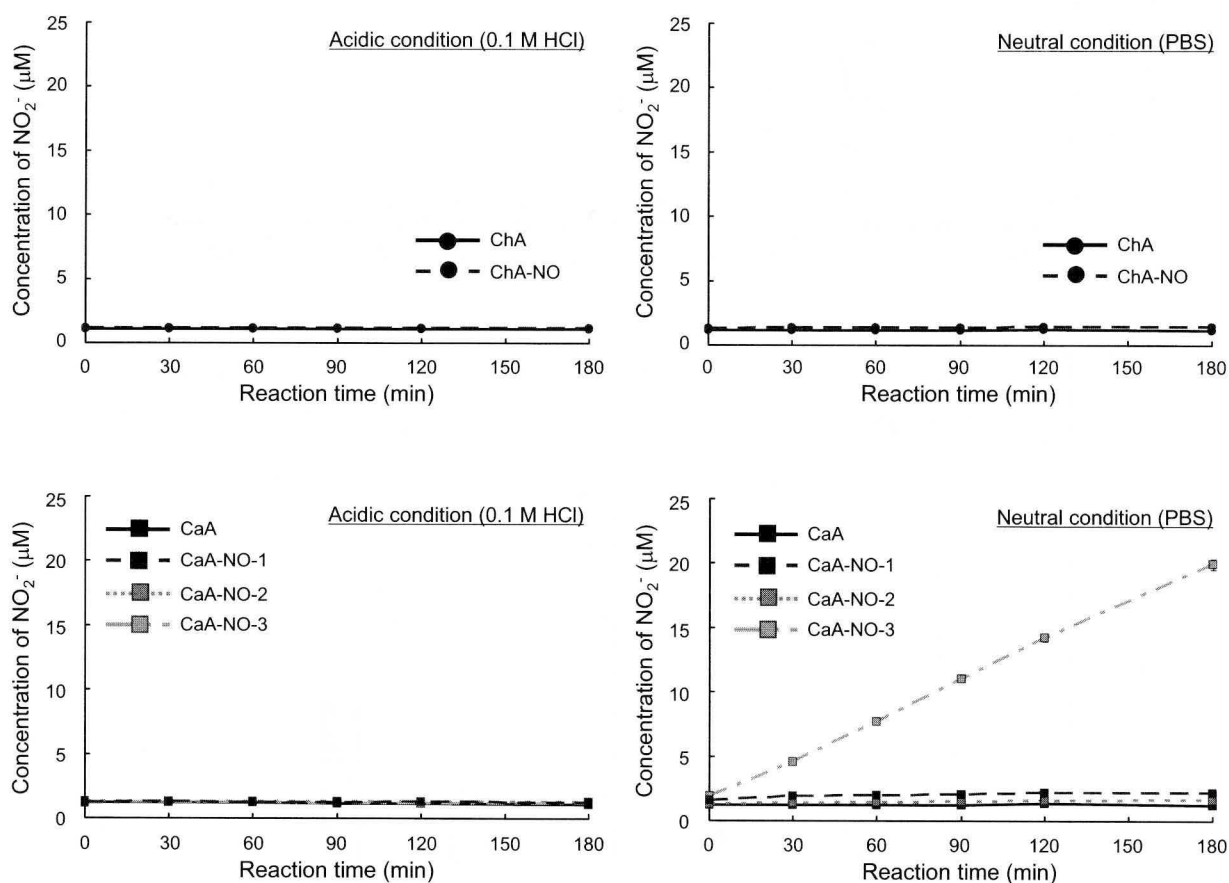


Figure 13 Concentration of  $\text{NO}_2^-$  as assessed by Griess assay

Data points represent means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ).

本研究において、フェノール性化合物と銅の併用が ROS の生成に関与しているかについて *in vitro* で検証した。そのために、ESR を用いたフェノール性化合物と金属の反応を評価できる新たな $\cdot\text{OH}$  測定法の開発を行った。構築した方法を適用したところ、フェノール性化合物と銅を併用することにより、Prooxidant 作用が増強することが明らかとなった。更に、ESR で得られた結果が生体に与える影響を確認するために DNA 酸化指標である 8-OHdG の測定を試みた。その結果、ESR と 8-OHdG の結果に相関性が認められ、産生した $\cdot\text{OH}$  が DNA を酸化させることにより、8-OHdG の値が上昇することが分かった。これら 2 つの分析法を相補的に使用することで、信頼性の高い Prooxidant の評価ができると考えられる。

食品に含まれている ChA および CaA と  $\text{NaNO}_2$  を併用することにより、胃酸酸性条件下でニトロ化反応を引き起こす結果が得られた。ニトロ化反応は反応における溶媒の pH とフェノール性化合物の化学構造によってベンゼン環が直接ニトロ化反応を受ける場合と、側鎖がニトロ化される場合がある。ベンゼン環がニトロ化反応を受ける場合、電子密度が大きく変化すると考えられ、 $\cdot\text{OH}$  に代表されるような反応性が高い分子種はベンゼン環に結合し Antioxidant 作用を有するものと考えられた。

他方、CaA のように側鎖にニトロ化が起こった場合、不安定な化学構造になることが考えられ、ROS 生成には寄与しないが、RNS の生成を引き起こす可能性がある。RNS は ROS と反応することでペルオキシナイトライトなど反応性の高い分子種に変化することが知られている<sup>70)</sup>。今回、Griess 法によって活性が認められた CaA-NO-3 については、構造内にフロキサン骨格を有している。フロキサン骨格は NO のドナーとして使用される構造である<sup>71-73)</sup>。そのため、CaA と  $\text{NaNO}_2$  を併用して生成された CaA-NO-3 については、 $\text{NO}_2$  が産生したものと考えられ、今後、生体影響などを解明する必要があると考えられる。

本研究の結果から、フェノール性化合物と金属または  $\text{NaNO}_2$  の併用によって ROS および RNS が発生することを示唆し、食品の複合反応が ROS および RNS の産生に寄与する一要因であることを示した。

### 第 3 章 酸化および窒素化ストレス評価のための唾液中グルタチオンの測定

#### 第 3-1 節 序論

生体中には酸化性物質と還元性物質が存在しており、これらの物質は生体の恒常性維持のため、一定量のバランスが保たれた状態にある。しかし、酸化および窒素化物質が過剰な状態となることがあり、この状態を酸化および窒素化ストレスという<sup>1)</sup>。酸化および窒素化ストレスは、疾病の発症に深く関与しており、生体内の酸化および窒素化ストレス状態を把握する事は、これらが関与する疾病の診断に有用であると考えられている。生体内の GSH および GSSG は、酸化および窒素化ストレスに対応し、生体の恒常性を維持しているとの報告<sup>38,39)</sup>があり、更に、GSH および GSSG の濃度比 (GSSG/GSH) を取ることで、酸化および窒素化ストレスの評価につながると考えられている。そこで、測定対象物質として GSH および GSSG を選出した。

従来、主な臨床試料として血液が用いられているが、血液の採取は侵襲的であり、採血行為に関しては法的な規制がなされている。また、血液にはウイルス性疾患に感染する危険性があることなどから、簡便なスクリーニング法としては汎用性が低い。

一方、唾液試料は非侵襲的な採取が可能であり、ヒトに対して肉体的、精神的な負荷を及ぼさない生体試料であると考えられる<sup>74-76)</sup>。本研究では、唾液試料を用いて、GSH および GSSG の同時分析法を構築し、同一人の血液試料と唾液試料における、GSH および GSSG 比の相関性を検討することで、唾液中 GSH および GSSG 測定の有用性を評価した。



### 第 3-2 節 親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法による唾液中グルタチオン 分析法の構築

#### 第 3-2-1 項 分離条件の検討

測定対象物質である GSH および GSSG は高極性物質であるため、通常の ODS カラムを用いた RPC では十分な保持が得られない。RPC において、GSSG の保持比 ( $k'$ ) を算出したところ 0.25 となり、ODS 系カラムにほとんど保持されていないと考えられた。さらに、移動相の組成を変更しても GSSG の保持時間に大きな変化は認められなかった。そのため、既報では GSH に存在するチオール基を誘導体化して極性を下げることで、RPC によって測定されている<sup>41-43)</sup>。しかし、GSSG はチオール基がジスルフィド結合しているため、誘導体化が困難である。

そこで、GSSG を誘導体化させることなく分離させる方法として、高極性物質の保持が可能な HILIC による分離を検討した。HILIC を用いた場合、移動相のアセトニトリルの比率を上げて GSSG をカラムに保持させること ( $k' = 3.73$ ) が可能となった (Figure 1)。移動相の最適化を行うために、有機溶媒相としてアセトニトリル、メタノール、アセトンおよびイソプロパノールを、水系溶媒相としてトリフルオロ酢酸、ギ酸および酢酸溶液をそれぞれ検討した。その結果、移動相中の有機溶媒の比率の上昇および極性の低下に伴って GSSG の保持時間は遅くなる傾向が認められた。水系溶媒相においては、水相に各種有機酸を添加した場合、イオン化強度に変化が認められた。特に、ギ酸を用いた時に MS の検出においてイオン化強度が最も大きくなった (Figure 2)。さらに、水系移動相の濃度および pH を検討した結果、緩衝液の濃度は 0.5 mM、pH 4.0 のときに測定対象物質が最大の強度を示した (Figure 3)。以上の結果から、有機溶媒相はアセトニトリル、水系溶媒相は 0.5 mM ギ酸緩衝液 (pH 4.0) が移動相の組成として最適と判断した。

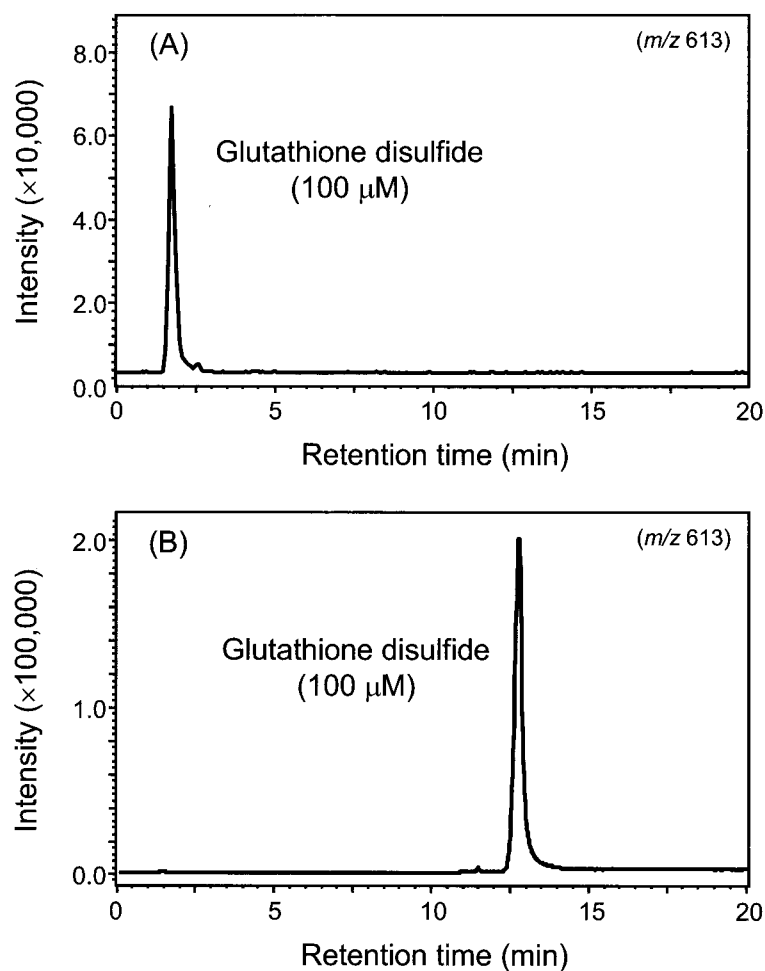


Figure 1 Chromatograms of GSSG (100  $\mu$ M) as obtained by (A) ODS and (B) HILIC column (A) CAPCELL PAK (150  $\times$  2.1 mm, 5  $\mu$ m; SHISEIDO, Tokyo, Japan), (B) Atlantis<sup>TM</sup> HILIC silica column (150  $\times$  2.1 mm, 5  $\mu$ m; Waters, Tokyo, Japan). The mobile phase of (A) was 0.5 mM formate buffer (pH 4.0) / acetonitrile (95:5, v/v). The mobile phase of (B) was 0.5 mM formate buffer (pH 4.0) / acetonitrile (10:90, v/v).

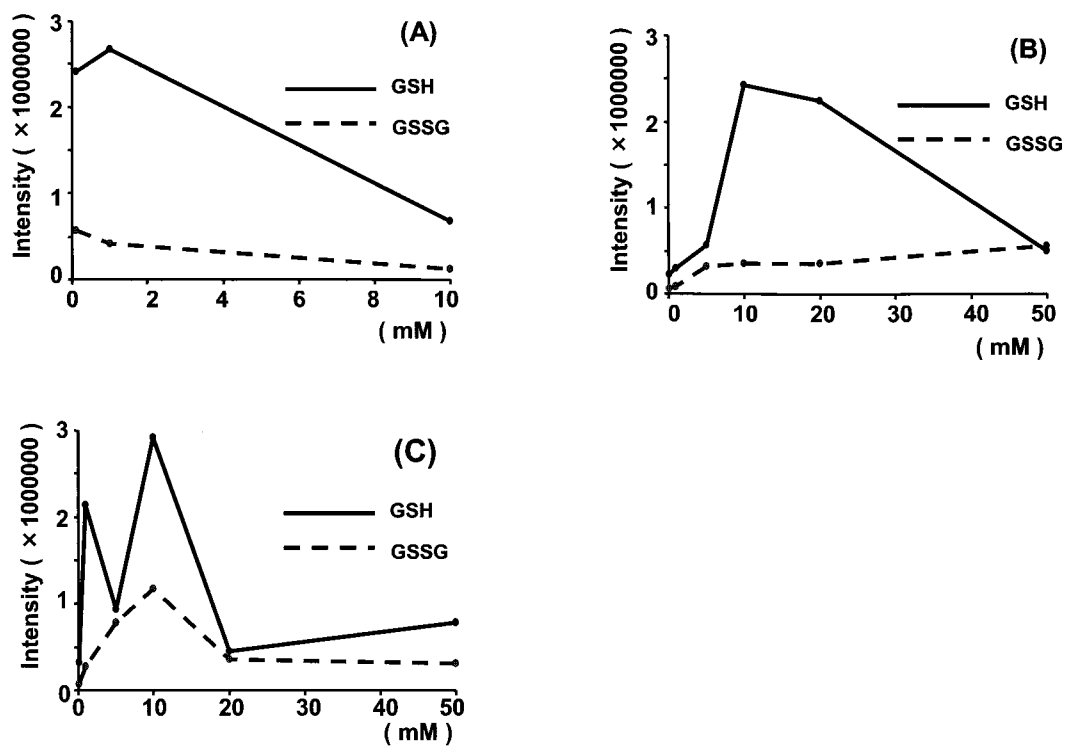


Figure 2 Effect of concentration of organic acid on relative peak intensity  
(A) trifluoroacetic acid, (B) acetic acid and (C) formic acid.

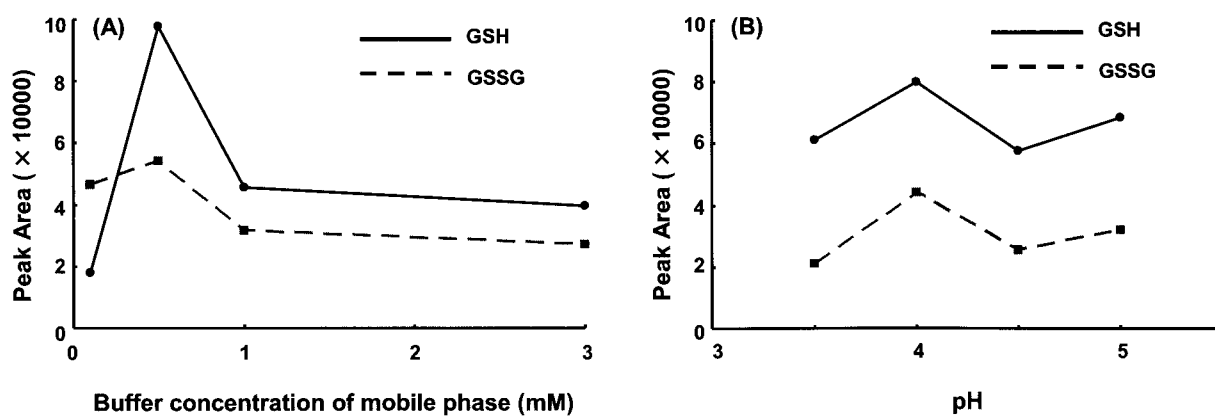


Figure 3 Effect of pH and concentration of mobile phase on peak area of GSH and GSSG

### 第 3-2-2 項 還元型グルタチオンの誘導体化

GSH は HILIC カラムを用いることでカラムに保持させることが可能であるが、前処理操作などで自動酸化を受け GSSG へ変化する恐れがある<sup>40)</sup>。従来、自動酸化を防ぐ目的で、チオール基を保護するさまざまな誘導体化方法が報告<sup>41-43)</sup>されており、本研究でも誘導体化試薬である NEM、5,5'-ジチオビスニトロ安息香酸 (DTNB) および 2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) をそれぞれ比較検討した。その結果、DNFB では反応が進まず、誘導体化後に観測される予定の  $m/z$  472 が検出されなかったため不適と判断した。NEM および DTNB は誘導体化が速やかに進行し、分子量関連イオンのピークである  $m/z$  433 および  $m/z$  505 が観察されたが、第 1-1-5 項で確認された通り、イオン化の強度が大きい NEM を誘導体化試薬として採用した (Figure 4)。GSH と NEM の反応条件を検討した結果、30 分以降で一定のイオン化強度を示したため、反応時間は 30 分とした。

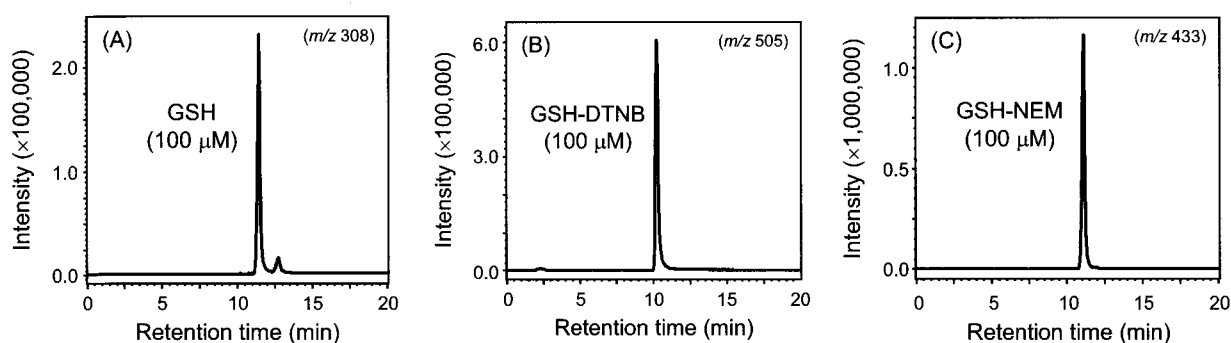


Figure 4 Chromatograms of (A) GSH, (B) GSH-DTNB and (C) GSH-NEM as obtained by HILIC/MS method

### 第 3-2-3 項 MS 測定条件の最適化

MS 測定における最適操作条件を検討するために、GSH-NEM と GSSG 標準品を用いて、MS のイオン化等の測定条件を種々検討した。移動相にアセトニトリル : 0.5 mM ギ酸緩衝液 (pH 4.0) = 90 : 10 (v/v) 混液を用い、大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization : APCI) およびエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization : ESI) の正、負イオンモードでの測定を比較検討した結果、ESI の正イオンモードで高いイオン強度が得られた。その際、GSH-NEM および GSSG のマススペクトルから  $[M+H]^+$  を分子量関連イオンのピークとする  $m/z$  433、613 のピークが得られた。また、GSSG においてフラグメントイオンである  $m/z$  308 [GSH] のピークが観察されたことから、得られたピークが GSSG であることを確認した (Figure 5)。  $m/z$  433 および 613 を SIM 用イオンとして、Q-array direct current (DC) 電圧 (0~80 V)、Q-array radio frequency (RF) 電圧 (0~150 V) について種々検討した結果、GSH-NEM、GSSG とともに DC 電圧は 20 V、RF 電圧は 150 V がイオン化における最適電圧であった (Figure 6)。その他、CDL 電圧、ブロックヒーター温度、CDL 温度、ネブライザーガスの各条件はそれぞれ 0 V、300°C、300°C、1.5 L/min において GSH-NEM および GSSG を最も感度よく検出することができた。この条件で GSH-NEM および GSSG 標準品を測定した結果、良好なクロマトグラムが得られた (Figure 7)。

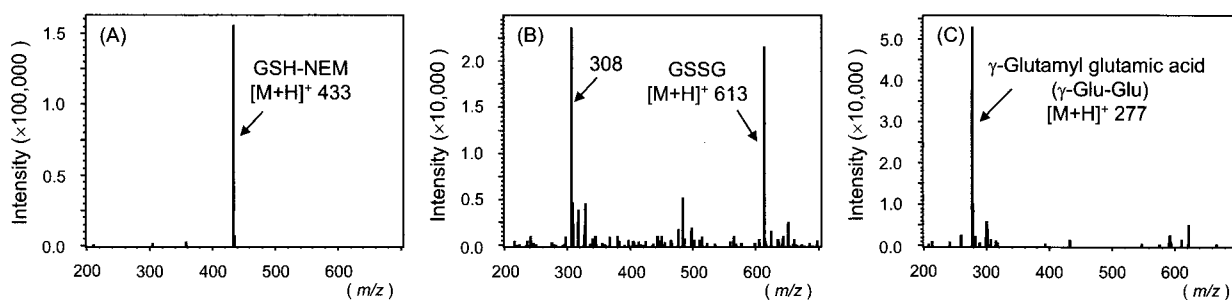


Figure 5 Mass spectra of (A) GSH-NEM, (B) GSSG and (C)  $\gamma$ -glutamyl-glutamic acid (100  $\mu$ M)

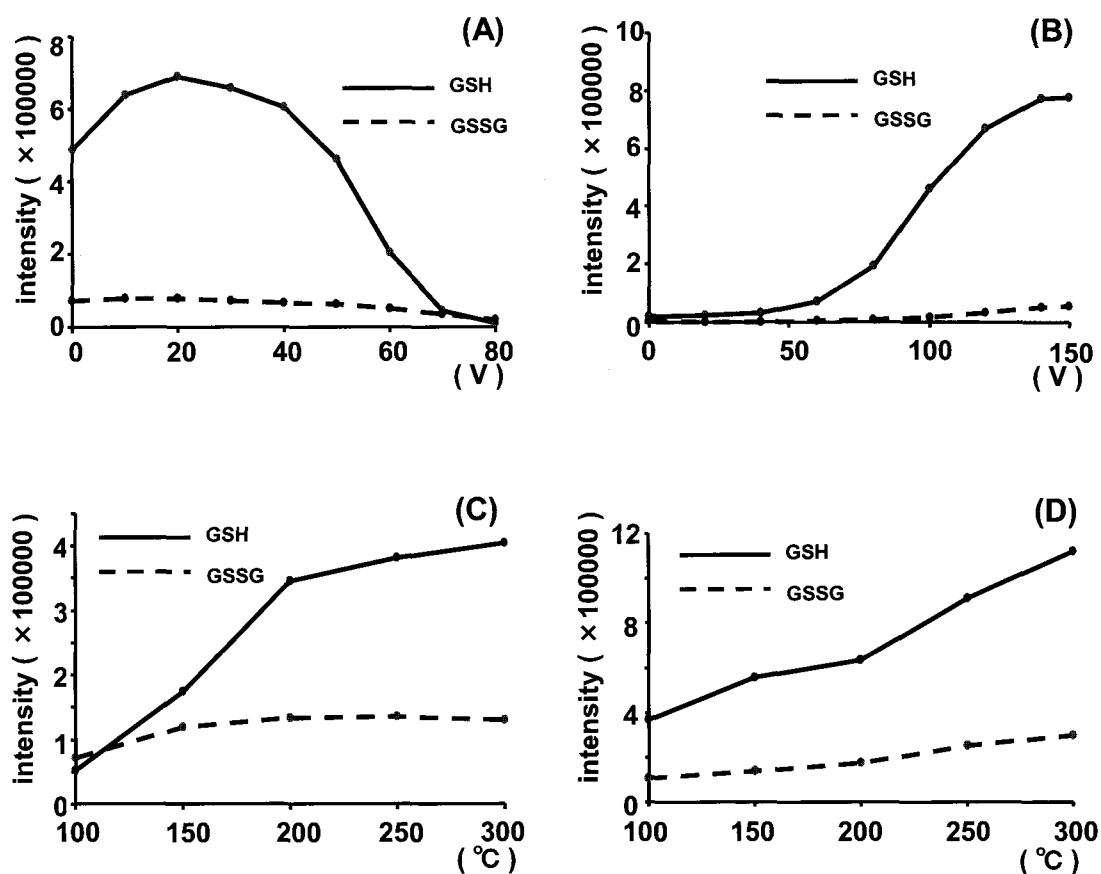


Figure 6 Effect of various voltage and temperature of MS measurement on relative intensity  
(A) DC voltage, (B) RF voltage, (C) CDL temperature and (D) Block temperature.

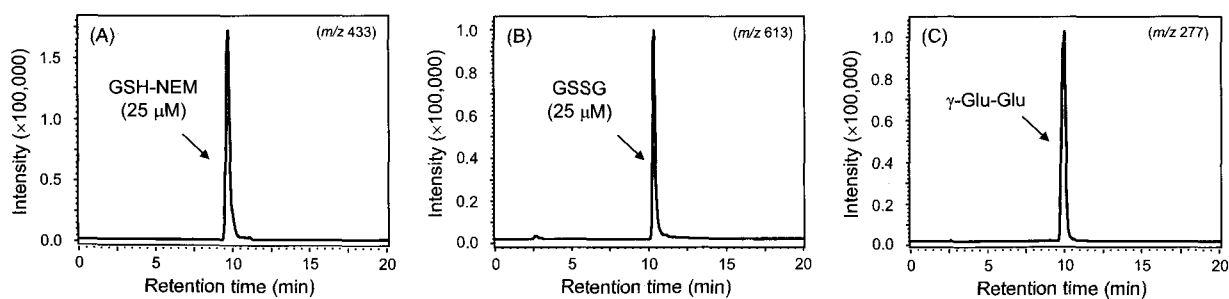


Figure 7 Chromatograms of (A) GSH-NEM, (B) GSSG and (C)  $\gamma$ -glutamyl-glutamic acid (100 μM) as obtained by HILIC/MS method

#### 第 3-2-4 項 固相抽出法による試料前処理

ヒト生体試料中の血液および唾液中には測定対象物質が低濃度で存在するため、夾雑物質の影響を大きく受けると考えられる。そこで、濃縮・精製を目的とした生体試料の前処理方法として、Waters 社製 Oasis<sup>®</sup> HLB および MAX を用いた固相抽出法を検討した。Oasis<sup>®</sup> HLB を用いた場合、負荷の段階で GSSG をカートリッジに保持させることができなかった。しかし、Oasis<sup>®</sup> MAX を用いた場合、血液および唾液に含まれる他の夾雑物質の除去および目的成分を濃縮することが可能となり、良好なクロマトグラムを得ることができた (Figure 8)。更に、添加回収試験の結果、低濃度および高濃度において回収率 90%以上の結果を得ることができた (Table 1)。

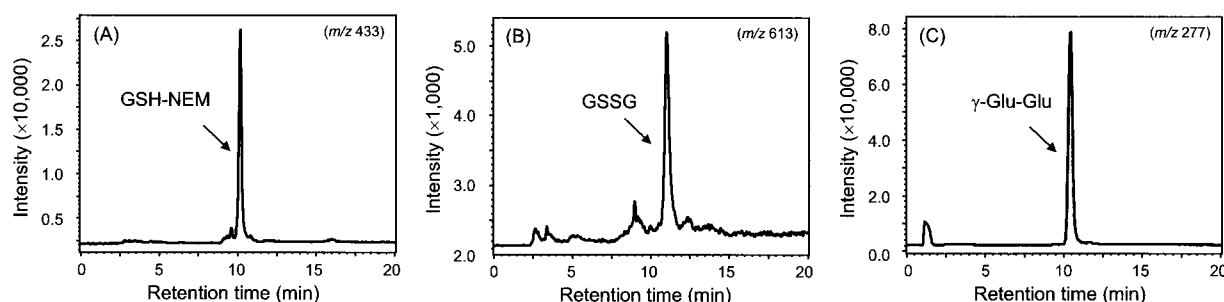


Figure 8 Chromatograms of (A) GSH-NEM, (B) GSSG and (C)  $\gamma$ -glutamyl-glutamic acid (100  $\mu$ M) in human saliva samples, as obtained by HILIC/MS method

Table 1 Recovery test of GSH-NEM and GSSG in human saliva samples

Analytical compound	Spiked concentration					
	HLB		MAX			
	50 $\mu$ M		25 $\mu$ M		50 $\mu$ M	
	Average	R.S.D.	Average	R.S.D.	Average	R.S.D.
Glutathione-NEM	79.7	5.6	91.5	7.5	92.2	7.2
Glutathione disulfide	2.7	1.1	91.6	15.0	101.6	4.1

(n = 6)

R.S.D.: relative standard deviation

### 第 3-2-5 項 分析法バリデーション

構築した分析法の妥当性を評価するために、GSH-NEM および GSSG 標準品を用いて、分析能パラメーターとして検出限界（LOD）、定量限界（LOQ）および検量線を求めた。唾液中の GSH-NEM および GSSG の LOD（S/N = 3）は 0.1  $\mu$ M および 0.3  $\mu$ M となり、LOQ（S/N > 10）は 0.5  $\mu$ M および 1  $\mu$ M となった。検量線を作成したところ、良好な直線性（ $r > 0.99$ ）と再現性が得られた（Table 2 および 3）。試料の安定性試験を行ったところ、測定対象物質は前処理過程で分解することなく、安定に存在することが明らかとなった（Table 4）。また、構築した分析法の再現性を確認するため、日内変動および日間変動を求めたところ、LOQ 付近で相対標準偏差（RSD）のばらつきがみられたものの、おおむね 15%未満と良好な結果が得られた（Table 5）。また、夾雑物質によるマトリックス効果を検討するために、水とプール唾液をそれぞれ希釈溶媒としたときの検量線を作成した。その結果、それぞれの検量線の傾き、切片に大きな違いが認められず、同一の検量線を作成することができたため、試料前処理の有用性が確認された（Figure 9）。これらの結果から、構築した分析法の信頼性が検証された。

Table 2 Analytical validation of HILIC/MS of GSH-NEM and GSSG

Analytical compound	LOD ( $\mu$ M)	LOQ ( $\mu$ M)	Correlation Coefficient	R.S.D. (PA) (%)	R.S.D. (RT) (%)
Glutathione-NEM	0.1	0.5	0.999 ( 0.5~100 )	5.06	0.14
Glutathione disulfide	0.3	1	0.996 ( 1~100 )	4.58	0.27

LOD : S/N = 3  
LOQ : S/N > 10

R.S.D.: relative standard deviation



Table 3 Accuracy and precision of calibration curve

Analytical compound	Spiked concentration ( $\mu\text{M}$ )	Back calculated concentration ( $\mu\text{M}$ )	Accuracy (%)
Glutathione-NEM	0	N.D.	
	1.0	1.2	115.7
	2.5	2.6	106.0
	5.0	5.2	103.9
	7.5	7.9	105.2
	10	9.9	99.5
	20	19.1	95.5
	50	49.7	99.5
	100	99.1	99.1
Glutathione disulfide	0	1.1	
	1.0	2.4	134.5
	2.5	3.4	102.4
	5.0	5.8	97.4
	7.5	8.2	97.7
	10	10.8	99.1
	20	21.4	102.6
	50	49.2	96.6
	100	102.6	102.6

Table 4 Stability of GSH and GSSG during storage at various conditions

Analytical compound	Temperature	Actual concentration	Detected concentration (mean $\pm$ S.D., n = 6)					
			Days of storage					
			1	2	3	4	5	6
Glutathione	25°C	50	48.4 $\pm$ 0.7	52.8 $\pm$ 0.9	48.1 $\pm$ 0.8	48.0 $\pm$ 1.8	47.0 $\pm$ 1.8	47.3 $\pm$ 1.3
		100	96.8 $\pm$ 2.2	98.2 $\pm$ 1.1	99.3 $\pm$ 0.4	95.0 $\pm$ 0.6	95.0 $\pm$ 1.9	93.4 $\pm$ 1.1
	4°C	50	51.4 $\pm$ 1.5	52.0 $\pm$ 1.2	49.6 $\pm$ 0.6	50.3 $\pm$ 1.9	48.1 $\pm$ 0.8	47.9 $\pm$ 1.1
		100	97.4 $\pm$ 2.6	103.2 $\pm$ 2.4	98.1 $\pm$ 0.4	97.1 $\pm$ 3.4	97.9 $\pm$ 2.1	97.6 $\pm$ 1.1
	- 20°C	50	51.8 $\pm$ 1.1	53.0 $\pm$ 2.2	49.1 $\pm$ 0.3	50.5 $\pm$ 1.2	50.1 $\pm$ 1.9	49.8 $\pm$ 1.0
		100	98.5 $\pm$ 1.9	103.1 $\pm$ 1.8	98.7 $\pm$ 0.6	97.5 $\pm$ 1.3	101.9 $\pm$ 1.2	97.9 $\pm$ 1.6
Glutathione disulfide	25°C	50	49.4 $\pm$ 1.3	49.2 $\pm$ 1.3	49.2 $\pm$ 1.3	49.7 $\pm$ 1.2	48.3 $\pm$ 1.3	49.3 $\pm$ 1.2
		100	99.5 $\pm$ 2.0	98.2 $\pm$ 1.4	98.4 $\pm$ 1.7	98.8 $\pm$ 3.4	98.2 $\pm$ 0.4	98.5 $\pm$ 1.9
	4°C	50	49.4 $\pm$ 1.6	50.6 $\pm$ 1.7	50.3 $\pm$ 1.5	49.5 $\pm$ 1.2	51.0 $\pm$ 1.2	50.4 $\pm$ 2.3
		100	97.8 $\pm$ 1.3	102.3 $\pm$ 2.4	100.5 $\pm$ 1.5	97.8 $\pm$ 1.3	101.3 $\pm$ 2.3	100.6 $\pm$ 2.5
	- 20°C	50	50.5 $\pm$ 1.7	49.9 $\pm$ 1.3	49.9 $\pm$ 1.4	49.4 $\pm$ 1.2	50.3 $\pm$ 1.7	51.4 $\pm$ 1.4
		100	103.7 $\pm$ 1.8	98.8 $\pm$ 1.7	99.7 $\pm$ 1.7	98.0 $\pm$ 1.3	103.2 $\pm$ 2.5	102.4 $\pm$ 2.3

Table 5      Intraday and interday precision and accuracy of quantifying GSH-NEM and GSSG using HILIC/MS

Analytical compound	Actual concentration	Detected concentration (mean $\pm$ S.D., n = 6)	Precision (R.S.D.) (%)	Accuracy (R.E.) (%)
Intraday				
Glutathione-NEM	1	$0.99 \pm 0.12$	12.0	-1.21
	10	$10.01 \pm 0.56$	5.6	0.08
	100	$99.6 \pm 6.78$	6.8	-0.44
Glutathione disulfide	1	$0.98 \pm 0.06$	6.3	-2.04
	10	$10.1 \pm 0.33$	3.2	1.02
	100	$99.1 \pm 4.4$	4.4	-0.89
Interday				
Glutathione-NEM	1	$1.01 \pm 0.17$	16.4	1.26
	10	$10.00 \pm 0.24$	2.4	-0.03
	100	$99.8 \pm 1.1$	1.1	-0.16
Glutathione disulfide	1	$1.15 \pm 0.13$	11.4	14.70
	10	$9.93 \pm 0.35$	3.6	-0.65
	100	$101.8 \pm 0.9$	0.9	1.76

S.D.: standard deviation  
R.S.D.: relative standard deviation  
R.E.: relative error

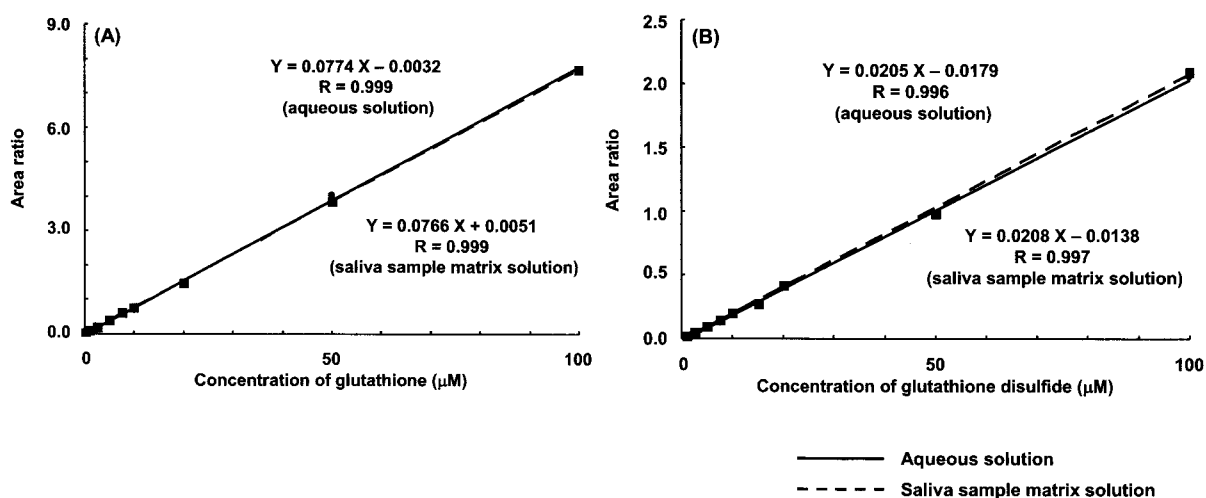


Figure 9      Calibration curves of (A) GSH-NEM and (B) GSSG in aqueous solution and saliva sample matrix solution

### 第 3-3 節 生体試料への応用および血液と唾液の相関性

構築した分析法を用い、健常者 10 名の血液および唾液中 GSH、GSSG 濃度を定量した (Figure 10)。その結果、血液においては既報の濃度<sup>77,78)</sup>と比較してほぼ同様の値が得られたことから、本分析法の定量値は妥当であると考えられる。また、唾液試料の有用性を確認するために、GSSG/GSH を算出し、全血と唾液の相関性をみたところ、有意な相関性 ( $r = 0.806$ ) が認められた (Figure 11)。従って、唾液中 GSH および GSSG を測定することは血液試料に代わり、酸化および窒素化ストレスを評価できる有用なバイオマーカーであることが示唆された。

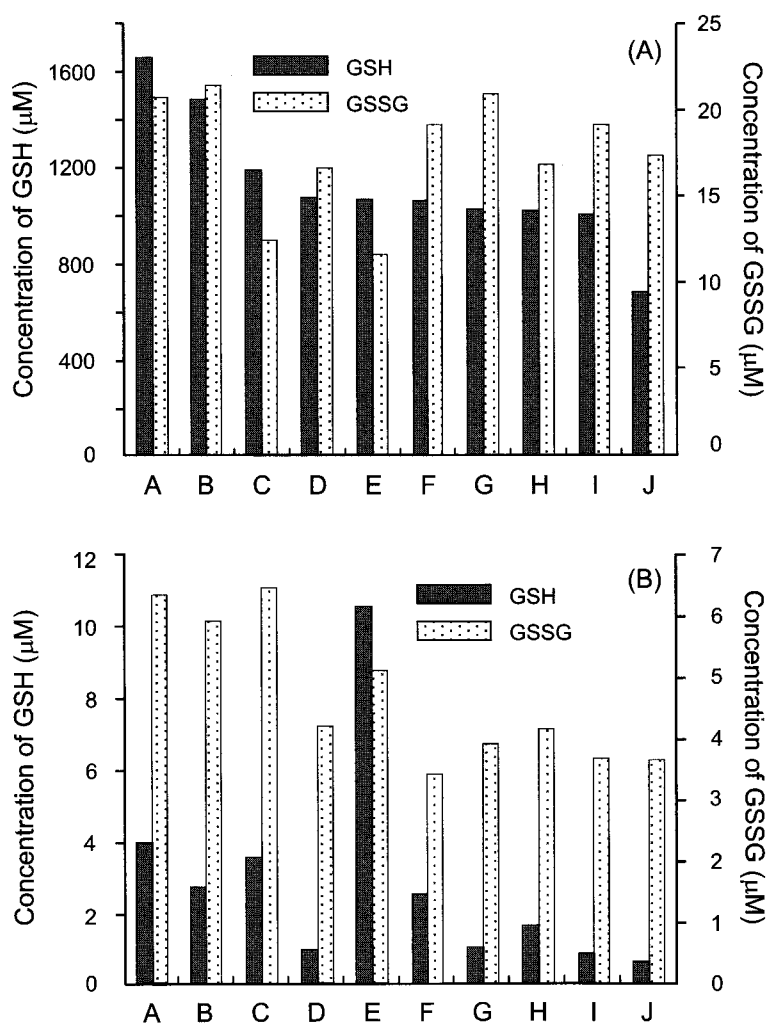


Figure 10 Concentration of GSH and GSSG in human (A) blood and (B) saliva samples

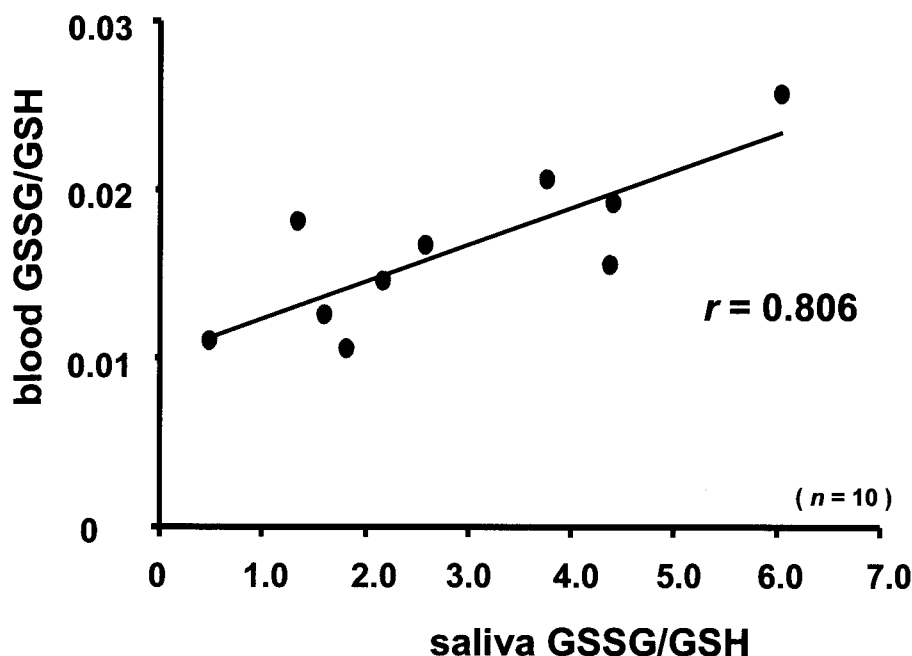


Figure 11 Correlation with concentration in blood and saliva of GSH and GSSG

#### 第 3-4 節 小括

酸化および窒素化ストレスを評価するために GSH と GSSG を選定し、被検試料として非侵襲的で簡便な採取が可能な唾液に注目して GSH および GSSG の測定法を構築した。検出器として高感度・選択的な検出ができる MS を使用することで、生体試料に微量で存在する GSH および GSSG を定量することができた。また、生体試料の前処理方法として、固相抽出法を適用したことで、生体試料の共存物質を除去および試料の濃縮を行うことが可能となり、良好なクロマトグラムを得ることができた。開発した分析法を全血および唾液試料の分析に適用したところ、全ての検体で GSH と GSSG を高感度且つ高精度に定量することができた。また、酸化および窒素化ストレスの指標となる GSSG/GSH において血液中と唾液中の間に有意な相関性がみられた。これらのことから、唾液中 GSH および GSSG は血液試料に代わり、酸化および窒素化ストレスを評価できる有用なバイオマーカーであることが示唆された。

## 総括

本研究では、我々の生活習慣が酸化および窒素化ストレス產生に及ぼす影響を評価するために、酸化物質と抗酸化物質に着目し、*in vitro*、*in vivo* で酸化および窒素化ストレス状態の評価が可能な高感度・選択的な生体内バイオマーカー分析法を検討した。更に、構築した分析法を *in vitro* および *in vivo* に適用し、その有用性を評価した。

第1章では、酸化および窒素化ストレス状態を評価するためのバイオマーカー分析法の開発のために、酸化物質である ROS の代表物質として $\cdot\text{OH}$ について、ESR による検出法を検討した。更に、ROS が DNA に及ぼす影響を評価するために、高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光度検出/電気化学検出を用いて DNA 酸化指標である 8-OHdG の測定を試みた。次に、ROS および RNS がタンパク質およびアミノ酸へ及ぼす影響を評価するため、ROS と生体内の Phe が反応して生じる *o*-Tyr および *m*-Tyr、RNS と生体内の *p*-Tyr が反応して生じる 3-NT の同時分析法の構築を行った。生体内抗酸化物質として反応性の高いチオール化合物 (GSH、GSSG、Cys、CysSS、Hcy および HcySS) を測定対象物質に選定し、カラムスイッチング-HILIC/MS による血清中チオール化合物分析法を構築した。構築した分析法によって、*in vitro*、*in vivo* で酸化および窒素化ストレス状態の評価が可能であることを示した。

第2章では、食品の複合反応が ROS および RNS 生成に与える影響を評価するために、第1章で構築した方法を用いて *in vitro* で ROS および RNS を評価した。その結果、フェノール性化合物と銅を併用することにより、ROS の產生が認められ、DNA 酸化指標である 8-OHdG の量が増加した。更に、フェノール性化合物の一つである ChA および CaA と発色剤として使用されている  $\text{NaNO}_2$  を併用することで、一部のニトロ化合物は *in vitro* で  $\text{NO}_2$  を產生することが確認され、ROS および RNS の生成に関与していることが明らかとなった。

第3章では、第1章で有用性が確認された GSH および GSSG について、非侵襲的に採取が可能な唾液試料に着目し、その有用性について検討した。その結果、本分析法によって、全ての検体から GSH と GSSG を高感度、選択的に定量することが可能となり、唾液試料は

血液試料に代わる生体試料として適用可能であることが示唆された。

本研究では、ROS および RNS が DNA、タンパク質および抗酸化物質（チオール化合物）と反応した場合に変動が認められるバイオマーカーを検討し、その分析法を構築した。更に、このバイオマーカーの測定をヒト生体試料への適用を考え、血液に代わる非侵襲的な採取が可能な唾液試料が有用であることを示した。本研究の成果は、ROS および RNS が生体に及ぼす影響を調べる上でその一助になるものと期待される。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻ならびにご高関を賜りました星薬科大学薬品分析化学教室 教授 中澤裕之博士に謹んで御礼申し上げます。

研究に際して終始御指導、御助言を頂きました星薬科大学薬品分析化学教室 准教授 斉藤貢一博士、助教 伊藤里恵博士に心から感謝いたします。

本研究の一部は、平成 20-24 年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「現代人の抱える疾患による脳高次機能変化に関する薬学的研究」に基づき行いました。研究を遂行するにあたり、御指導、御助言をいただきました星薬科大学薬品毒性学教室 教授 鈴木 勉博士、研究班の先生方に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究の一部は、平成 22-24 年度厚生労働科学研究「食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究」に基づき行いました。研究を進めるにあたり、御指導、御助言をいただきました国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長 西川秋佳博士、病理部 室長 梅村隆志博士、石井雄二博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究の分析法バリデーションに関して、米国 FDA/CDRH 留学中に多くの御指導、御支援をいただきました Ronald Brown 博士、Anne Lucas 博士、Peter Goering 博士、Andrew Steen 博士に厚く御礼申し上げます。

生体試料の取り扱いに際し、御指導、御助言を頂きました元東海大学産婦人科教授（現 東部病院院長）牧野恒久博士、山口大学大学院医学系研究科産婦人科学教室 教授 杉野法広博士、東京大学大学院農学生命科学研究科細胞生化学研究室 教授 塩田邦郎博士に謹んで御礼申し上げます。

また、研究に際して数々の御助言、御助力頂きました元助教授（現 日本統合医療学園学長）吉村吉博博士、元助手（現 米国疾病センター）加藤嘉代子博士、元助手（現 金城学院大学助教）井之上浩一博士に心から感謝いたします。

さらに、本研究にあたり、多大なる御協力と種々の御助力を頂きました星薬科大学薬品分析化学教室 並木達也修士、川口 研博士、星 美由紀様、大柄敦資修士、斉藤勇介様、坂田 脩様、平澤貴之修士、寺山絵美様、中野有紀様、望月圭祐様、後藤正人様、丸山陽介様、野本真希様、丸谷菜摘様を始め、星薬科大学薬品分析化学教室の皆様、諸先生方に心から感謝いたします。

## 実験の部

### 第 1 章

#### 1.1. 試薬および試料

5,5'-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) および  $\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitrone (POBN) は Labotech 社製 (Tokyo, Japan) を用いた。

Dimethyl sulfoxide (DMSO)、過酸化水素水 (30%)、nuclease P1、sodium iodide、reduced glutathione (GSH)、glutathione disulfide (GSSG)、*N*-benzylmaleimide (NBenzM)、*N*-cyclohexylmaleimide (NCycloM) および dithiothreitol (DTT) は和光純薬工業株式会社製 (Tokyo, Japan) を使用した。

Copper(II) sulfate pentahydrate、ammonium iron(II) sulfate hexahydrate、DL-phenylalanine (Phe) および 4-nitro-DL-phenylalanine (4-NP) は関東化学株式会社製 (Tokyo, Japan) を使用した。

Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, disodium salt (EDTA-2Na)、bathocuproinedisulfonic acid, disodium salt、peroxynitrite 溶液 (ONOO<sup>-</sup>)、3-chlorocarbonyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1*H*)-quinoxalinone (DMEQ-COCl)、fluorescein-4-isothiocyanate (FITC-I) および 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) は株式会社 同仁化学研究所製 (Kumamoto, Japan) を用いた。

Catalase、superoxide dismutase (SOD)、deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus、phosphatase alkaline from bovine intestinal mucosa、deoxyguanosine (dG)、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、3-nitro-L-tyrosine (3-NT)、DL-homocysteine (Hcy)、DL-homocysteine (HcySS)、DL-cysteine (Cys)、DL-cystine (CysSS) および lipopolysaccharide (*Escherichia coli*, serotype 0111:B4) は Sigma 社製 (Tokyo, Japan) を用いた。

DL-Tyrosine (*p*-Tyr)、DL-*m*-tyrosine (*m*-Tyr)、DL-*o*-tyrosine (*o*-Tyr)、4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F)、9-fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc-Cl)、2,3-naphthalenedialdehyde (NDA) および *o*-phthalaldehyde (OPA) は東京化成工業株式会社製 (Tokyo, Japan) を使用した。

Glutathione (<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N<sub>1</sub>) (GSH-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N<sub>1</sub>) は Toronto Research Chemicals 社製 (Ontario, Canada) を使用した。L-cysteine (<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, <sup>15</sup>N<sub>1</sub>) (Cys-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, <sup>15</sup>N<sub>1</sub>) および DL-homocysteine (3,3,3',3',4,4,4',4'-d<sub>8</sub>) (HcySS-d<sub>8</sub>) は Cambridge Isotope Laboratories 社製 (Massachusetts,



USA) を用いた。

その他、溶媒は和光純薬工業株式会社製 (HPLC 用) を用いた。超純水は日本ミリポア製 Milli-Q の超純水装置で調製したものをを用いた。

## 1.2. 動物実験

実験動物の取り扱いについては「星薬科大学動物実験指針」に基づいて行った。6 週齢の ICR 雄性マウスを日本チャールズリバー株式会社から購入した。各群 6 匹ずつ 7 群に配し、約 1 週間の順化飼育を行った。動物の飼育は温度  $23 \pm 1$  °C、12 時間蛍光灯照明 (8:00 ~20:00) の条件下で行った。

## 1.3. 測定装置および分析条件

電子スピンの測定には JES-RE1X (JEOL 社製) を使用した。マイクロ波の周波数は 9.43 GHz に設定し、磁場を  $335.5 \pm 5$  mT とした。マイクロ波の出力を 9 mW、周波数変調を 100 kHz、時定数を 0.03 秒、掃引時間を 30 秒に設定した。ESR の測定は全て室温で行い、スペクトル強度は内部標準物質であるマンガン ( $\text{Mn}^{2+}$ ) を基準にした。

dG および 8-OHdG の測定には高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光光度検出/電気化学検出 (HPLC/UV/ECD) を使用した。紫外吸光光度検出器には SPD-10A (Shimadzu 社製) を用い、電気化学検出器は ESA Coulochem III (ESA 社製) を使用した。分析用ポンプとして LC-10AD<sub>vp</sub> (Shimadzu 社製) を用い、分析カラムには GL Sciences 社製 Inertsil ODS3 (150 × 4.6 mm, 3.0 μm) を使用した。カラム温度を 40 °C に設定し、移動相として 10 mM リン酸二水素一ナトリウム水溶液 / メタノール (97 : 3, v/v) を用いて、流速 1.0 mL/min で送液し、試料は 20 μL を注入した。UV 検出器は 290 nm に設定し、dG を定量した。ECD はガードセルを -350 mV、分析セルとして electrode 1, 150 mV および electrode 2, 300 mV に設定した。

機器分析によるチロシン類縁化合物の測定には、高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光光度検出/蛍光検出 (HPLC/UV/FL) を使用した。分析装置には SHISEIDO SI-II シリーズを用いた。移動相は 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH = 3.0) とアセトニトリルを用い、流速 0.2

mL/min で送液し、グラジエント操作によって分離した。分析カラムには SHISEIDO 社製 CAPCELL PAK MGII (150 × 2.0 mm, 3.0 μm) を用いた。UV を 210 nm、FL を励起波長 470 nm および蛍光波長 540 nm に設定し、NBD-F で誘導体化された対象物質を測定した。

チオール化合物の測定には液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) を使用し、カラムスイッチング法により前処理操作の自動化を図った。カラムスイッチングのタイムプログラムは Table 1 に示す。ポンプに LC-10AD<sub>VP</sub>、オートサンプラーに SIL-HT<sub>C</sub>、カラムオープンに CTO-10A<sub>VP</sub> を用いた。LC 条件は、前処理カートリッジに Waters 社製 Oasis HLB (20 × 2.1 mm) を用い、分析カラムに Merck 社製 ZIC-pHILIC (100 × 2.1 mm, 5 μm) を使用した。カラム温度を 40 °C に設定し、移動相として 10 mM 酢酸水溶液 / 10 mM 酢酸含有アセトニトリル (30 : 70, v/v) を用いて、流速 0.4 mL/min で送液し、試料は 10 μL を注入した。MS の条件として、装置には、SHIMADZU LCMS-2010 A を使用した。MS のイオン化は、ESI のポジティブモードで測定した。それぞれの化合物のモニタリングイオンは Table 2 に示す。その他の MS の条件はインターフェイス電圧 4.5 kV、CDL 温度 250 °C、ブロックヒーター温度 200 °C、ネブライザーガス 1.5 L/min として測定した。また、検量線および実試料の測定には、選択イオンモニタリング (SIM) モードで行った。

Table 1 Time program of column-switching HILIC/MS

Time (min)	Event	Column position
0.0	Sample injection	Configuration A
3.0	Valve change	Configuration B
15.0	Valve change	Configuration B
20.0	Next analysis	Configuration A

Table 2 MS parameters for each analyte

Analyte	<i>m/z</i>	DC (V)	RF (V)	CDL (V)
GSH	495	30	150	0
GSSG	487	40	150	25
Cys	309	20	135	0
CssC	301	10	105	0
Hcy	323	20	150	0
HccH	315	10	120	0

#### 1.4. 試料溶液の調製方法

##### 1.4.1. DMPO と POBN による $\cdot\text{OH}$ の相関性

DMPO-OH および POBN- $\text{CH}_3$ の相関性を評価するために、 $\cdot\text{OH}$ はフェントン反応を用いて、発生させた。過酸化水素水を 0~2.5 mM に調製し、それぞれに 1 mM の塩酸に溶解した 0.1 mM  $\text{FeSO}_4$ を加えた。発生した $\cdot\text{OH}$ を 100 mM DMPO で捕捉した。同様に、 $\cdot\text{OH}$ に DMSO を添加して産生する $\cdot\text{CH}_3$ を POBN を用いて捕捉した。

##### 1.4.2. LC/UV/ECD による dG および 8-OHdG 量の測定

精製水で 2 mg/mL に調製した仔牛胸腺 DNA を 250  $\mu\text{L}$  に PBS 溶液を 750  $\mu\text{L}$  加えた。37 °C、30 分間混和後、ヨウ化ナトリウム溶液で DNA を析出させ、40%イソプロパノール、70%エタノールで DNA を洗浄した。その後、ヌクレアーゼ P1 (500 units/mL) とアルカリフォスファターゼ (1000 units/mL) によって酵素分解を行い、DNA を断片化後、試料溶液とした。LC/UV/ECD による測定では、UV で dG を、ECD で 8-OHdG をそれぞれ定量して 8-OHdG/dG 比を算出し、DNA の酸化的損傷の指標とした。

##### 1.4.3. チロシン類縁化合物測定のための Oasis<sup>®</sup> MCX による前処理方法

###### および NBD-F による誘導体化

血清試料 (500  $\mu\text{L}$ ) にアセトニトリル (1500  $\mu\text{L}$ ) を加えて、除タンパク後、遠心分離操作 (10,000 g、5 min) で、得られた上清を窒素気流下で濃縮操作後、50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 5.0) で 1.0 mL に定容した。

その後、Oasis<sup>®</sup> MCX による固相抽出法に適用した。固相のプレコンディショニングにはメタノール (1 mL) および精製水 (1 mL) で行った。その後、定容した試料を 1.0 mL 負荷した。洗浄溶媒にはアセトニトリル (1 mL  $\times$  2) と 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.0、1 mL  $\times$  2) を用いた。溶出溶媒には 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 11.0、1 mL) を用い、測定対象物質を固相から溶出させた。得られた溶液を NBD-F による誘導体化に供した。

NBD-F による蛍光誘導体化方法は、試料 (250  $\mu\text{L}$ ) に 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 5.0、50  $\mu\text{L}$ ) を添加し、pH を 9.0 に調整後、アセトニトリルに溶解した 10 mM NBD-F (50  $\mu\text{L}$ ) を加え、60 °C、5 分間反応させた。氷冷後、アセトニトリル (100  $\mu\text{L}$ ) と 1 M HCl (50  $\mu\text{L}$ ) を加えて攪拌後、遠心分離操作 (10,000 g、5 min) を行った。得られた上清を HPLC/UV//FL の測定に供した。

#### 1.4.4. チオール類縁化合物測定のための誘導体化および試料前処理方法

血清を作製する段階での自動酸化を防ぐために、NBenzM をシリンジ内に 10  $\mu$ L 滴下させたテルモシリンジを用い、採血を行った。その後、血液を室温で 30 分間、放置後、遠心分離操作 (3,000 rpm、15 min) を行い、血清を作製した。

血清 (25  $\mu$ L) に PBS (100  $\mu$ L)、10 mM NBenzM 誘導体化試薬 (25  $\mu$ L) およびデフェロキサミン含有サロゲート物質 (25  $\mu$ L) を加え、37  $^{\circ}$ C、30 分間反応させることによって還元型チオール化合物を誘導体化した。その後、25 mM DTT (25  $\mu$ L) を加え、37  $^{\circ}$ C、30 分間反応させることによって酸化型チオール化合物を還元させた。最後に、50 mM NCycloM 誘導体化試薬 (25  $\mu$ L) およびデフェロキサミン含有サロゲート物質 (25  $\mu$ L) を再度加え、37  $^{\circ}$ C、30 分間反応させることによって還元させた酸化型チオール化合物を誘導体化した。全ての反応後、20%スルホサリチル酸 (25  $\mu$ L) を加え、除タンパク後、遠心分離操作 (10,000 g、5 min) を行い、得られた上清を試験溶液としてカラムスイッチング-HILIC/MS の測定に供した。

#### 1.5. 分析法バリデーション

本分析法のバリデーションは、FDA で推奨されている「Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation<sup>35)</sup>」を基に、Quality control (QC) 試料を作製後、LOD、LOQ、試料安定性試験、直線性、真度、精度について評価した。

LOD および LOQ は繰り返し 5 回測定を行い、ベースラインのノイズレベルの 3 倍を LOD とし、10 倍以上かつ真度および精度の RSD が 20%以内になる濃度を LOQ と定義した。

試料安定性試験は、QC 試料を -80  $^{\circ}$ C、4  $^{\circ}$ C および 25  $^{\circ}$ C で一定期間保存後、それぞれ測定を行い、安定性を評価した。

#### 1.6. 統計学的処理

還元型および酸化型チオール化合物の濃度は平均値  $\pm$  SD で表記した。得られた値は一元配置分散分析によって各群の間の有意差を検定し、その後、Scheffe 法によって評価した。

## 第 2 章

### 2.1. 試薬および試料

Caffeic acid (CaA)、*trans*-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (Ferulic acid, FA)、quercetin dihydrate (Que)、rutin、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epicatechin (EC)、gallocatechin (GC)、亜硝酸ナトリウム (NaNO<sub>2</sub>)、sulfanilamide および *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine は和光純薬工業株式会社製 (Tokyo, Japan) を使用した。Chlorogenic acid hydrate (ChA)、D-(-)-quinic acid (QA)、resveratrol (Res) および (+)-catechin (C) は東京化成工業株式会社製 (Tokyo, Japan) を使用した。(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)、(-)-epicatechin gallate (ECG)、(-)-gallocatechin gallate (GCG) および (-)-catechin gallate (CG) は Sigma 社製 (Tokyo, Japan) を用いた。

$\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitron (POBN) は Labotech 社製 (Tokyo, Japan) を用いた。Dimethyl sulfoxide (DMSO)、hydrogen peroxide (30%) および 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) は和光純薬工業株式会社製 (Tokyo, Japan) を使用した。Copper(II) sulfate pentahydrate は関東化学株式会社製 (Tokyo, Japan) を用いた。

Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus、phosphatase alkaline from bovine intestinal mucosa、deoxyguanosine (dG) および 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) は Sigma 社製 (Tokyo, Japan) を用いた。Nuclease P1 および sodium iodide は和光純薬工業株式会社製 (Tokyo, Japan) を使用した。

その他、溶媒は和光純薬工業株式会社製 (HPLC 用) を用いた。超純水は日本ミリポア製 Milli-Q の超純水装置で調製したものをを用いた。

### 2.2. 測定装置および分析条件

ROS の一種である  $\cdot\text{OH}$  の測定および dG および 8-OHdG の測定は第 1 章の方法に準じた。

Antioxidant 作用および Griess 法の測定は、BIO-RAD 社製 Model 550 マイクロプレートリーダーを用いて測定した。

ニトロ化を受けたフェノール性化合物の測定は、高速液体クロマトグラフィー/フォトダイオードアレイ検出 (LC/PDA) を使用した。PDA に SPD-M10Avp、ポンプに LC-10AD<sub>VP</sub>、オートサンプラーに SIL-HT<sub>C</sub>、カラムオープンに CTO-10A<sub>VP</sub> を用いた。分析カラムに Waters 社製 XBridge C18 (150 × 2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) を使用した。カラム温度を 40 °C に設定し、移動

相として 0.1%ギ酸水溶液 / 0.1%ギ酸含有アセトニトリル (90 : 10、v/v) を用いて、流速 0.2 mL/min で送液し、試料は 5  $\mu$ L を注入した。

### 2.3. 試料調製方法

#### 2.3.1. 吸光光度法による Antioxidant 作用の測定

DPPH を用いた Antioxidant 作用の測定では、メタノールに溶解した 2 mM の DPPH 溶液 (250  $\mu$ L)、メタノール (200  $\mu$ L) およびメタノールで溶解した各種フェノール性化合物 (50  $\mu$ L) をそれぞれ加え、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応溶液 300  $\mu$ L を測定試料とし、測定にはマイクロプレートリーダーを用い、波長 540 nm で吸光度を測定した。ラジカル消去率 (%) は次の式を用いた。

$$\% \text{ Antioxidant activity} = [A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}] / [A_{\text{control}} - A_{\text{ascorbic acid}}] \times 100$$

#### 2.3.2. ESR による Prooxidant 作用の評価

DMSO に溶解した 100 mM POBN (30  $\mu$ L) に PBS 溶液 (210  $\mu$ L)、メタノールに溶解した 20 mM の各種フェノール性化合物 (30  $\mu$ L)、水に溶解した 10 mM 硫酸銅 (30  $\mu$ L) を順に加え、300  $\mu$ L を反应用試料とした。37  $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベーションした後、ESR で測定した。また、インキュベーション前後の実験は全て室温で行った。

#### 2.3.3. HPLC/UV/ECD による Prooxidant 作用の評価

水に溶解した 2 mg/mL 仔牛胸腺 DNA を 250  $\mu$ L、メタノールで溶解した各種フェノール性化合物 (2 mM) 50  $\mu$ L と水に溶解した硫酸銅 (1 mM) 50  $\mu$ L、PBS 溶液 650  $\mu$ L の順に加えた。37  $^{\circ}$ C、30 分間混和後、ヨウ化ナトリウム溶液で DNA を析出させ、40%イソプロパノール、70%エタノールで DNA を洗浄した。その後、ヌクレアーゼ P1 (500 units/mL) とアルカリフォスファターゼ (1000 units/mL) によって酵素分解を行い、DNA を断片化後、試料溶液とした。LC/UV/ECD による測定では、UV で dG を、ECD で 8-OHdG をそれぞれ定量して 8-OHdG/dG 比を算出し、DNA の酸化的損傷の指標とした。

#### 2.3.4. ニトロ化合物の合成

ChA および CaA のニトロ化反応は Cotelle および Napolitano の報告<sup>79,80)</sup>を参考に行った。

ChA または CaA (5 mmol) を 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0、500 mL) に溶解後、NaNO<sub>2</sub> (25 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌させた。その後、反応溶液は酢酸エチルで液液分配 (150 mL × 3) を行い、有機相を抽出した。硫酸ナトリウムで脱水後、エバポレーターで減圧乾固させ、得られた粉末をメタノール (2 mL) に再溶解した。その後、オープンカラムクロマトグラフィーによる試料の精製および分取を行った。溶出溶媒として、トルエン：酢酸エチル = 80 : 20 (eluent A)、60 : 40 (eluent B) および 40 : 60 (eluent C) を用いることで、それぞれの化合物を単離精製した。得られた化合物は、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR および LC-PDA-ESI-MS によって解析を行い、論文値<sup>79,80)</sup>との比較を行うことで、同定した。それぞれの化合物の <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR および MS のデータを以下に示す。

Nitrochlorogenic acid (ChA-NO). UV: λ<sub>max</sub> (CH<sub>3</sub>OH) 276, 339, 430 nm. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 2.12 (m, 4H), 3.74 (dd, J = 10.0, 3.2 Hz, 1H), 4.20 (m, 1H), 5.42 (m, 1H), 6.31 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.15 (d, J = 15.6 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 39.5 (CH<sub>2</sub>), 41.3 (CH<sub>2</sub>), 73.2 (CH), 73.3 (CH), 75.3 (C), 78.2 (CH), 113.2 (CH), 116.0 (CH), 121.2 (CH), 125.6 (C), 140.7 (C), 144.0 (CH), 150.2 (C), 156.2 (C), 169.1 (C), 181.8 (C). ESI-MS: *m/z* 398 [M-H]<sup>-</sup>.

2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-oxoethanaloxime (CaA-NO-1). <sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 6.91 (d, 1 H, J = 8.8 Hz), 7.61 (dd, 1H, J = 8.8, 2.0 Hz), 7.62 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 7.91 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 115.2 (CH), 117.1 (CH), 124.5 (CH), 129.2 (C), 141.7 (C), 145.3 (C), 148.7 (CH), 187.1 (C). ESI-MS: *m/z* 180 [M-H]<sup>-</sup>.

6,7-Dihydroxy-1,2-(4H)-benzoxazin-4-one (CaA-NO-2). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 6.95 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 8.13 (s, 1H). ESI-MS: *m/z* 178 [M-H]<sup>-</sup>.

2-Oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2,5-oxadiazole (CaA-NO-3). UV: λ<sub>max</sub> (CH<sub>3</sub>OH) 247, 316 nm. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 6.89 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.92 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR δ (ppm): 113.9 (CH), 115.4 (C), 116.2 (C), 117.3 (CH), 120.1 (CH), 146.4 (CH), 147.5 (C), 149.7 (C). ESI-MS: *m/z* 193 [M-H]<sup>-</sup>.



#### 2.3.5. Griess 法による NO<sub>2</sub><sup>-</sup>生成量の評価

1 mM の試料溶液 (500 μL) に PBS または 0.1 M HCl (4500 μL) を加え、37 °C で反応させた。経時的に試料を回収 (150 μL) し、Griess 試薬 (25 mM sulfanilamide および 2.5 mM *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine 含有 2.5%リン酸溶液) を 150 μL 加え、室温で 5 分間反応させた。その後、遠心分離操作 (10,000 g、5 min) を行い、上清 200 μL を測定用試料とした。測定にはマイクロプレートリーダーを用い、波長 540 nm で吸光度を測定した。

#### 2.4. 統計学的処理

全ての結果は平均値 ± SD で表記した。得られた値は一元配置分散分析によって各群の間の有意差を検定し、その後、Dunnett 法によって評価した。

### 第 3 章

#### 3.1. 試薬および試料

Reduced glutathione (GSH)、glutathione disulfide (GSSG)、5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)、2,4-dinitrofluorobenzene および *N*-ethylmaleimide (NEM) は和光純薬工業株式会社製 (Tokyo, Japan) を使用した。唾液採取用キット サリベット®はアシスト社から購入した。

#### 3.2. 測定装置および分析条件

液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) の測定には SHIMADZU LCMS-2010 A を使用した。送液ポンプは LC-10AD<sub>VP</sub>、オートサンプラーには SIL-10AD<sub>VP</sub>、カラムオーブンは CTO-10A<sub>VP</sub> を用いた。分析カラムとして、Waters 社製 Atlantis<sup>TM</sup> HILIC Silica (150 × 2.1 mm, 5 μm) を使用した。カラム温度を 40°C に設定し、移動相としては、アセトニトリル / 0.5 mM ギ酸緩衝液 (pH 4.0) を用いて、90 : 10 (0-1min) ~ 70 : 30 (2-20 min) のグラジエント分析を行った。流量は 0.2 mL/min で送液し、試料は 5 μL を注入した。

MS のイオン化法は、ESI 法を用いた。また、検量線および実試料の測定には、SIM モードで測定した。GSH は NEM により誘導体化を行った GSH-NEM として評価した。GSH-NEM および GSSG のモニタリングイオンは、正イオンモード  $[M+H]^+$  である  $m/z$  433 および 613 とした。また、内標準物質である  $\gamma$ -Glu-Glu のモニタリングイオンは、正イオンモード  $[M+H]^+$  である  $m/z$  277 とした。その他の MS の条件は、インターフェイス電圧 5 kV、Q-array RF 電圧 150 V、Q-array DC 電圧 20 V、CDL 温度 300°C、ブロックヒーター温度 300°C、ネブライザーガス 1.5 L/min として測定した。

#### 3.3. 試料調製方法

唾液 (500 μL) または血液 (5 μL) 試料に、500 μM 内標準物質含有 40 mM NEM 溶液を 20 μL 添加し、室温で 30 分間反応後、pH 調整のために、50 mM 炭酸アンモニウムで 1.0 mL に定容した溶液を Oasis<sup>®</sup> MAX による固相抽出法に適用した。固相抽出条件は、固相のプレコンディショニングにはメタノールおよび精製水で行った。そして、試料を 1.0 mL 負荷した。次いで、アセトニトリル (1 mL)、50 mM 炭酸アンモニウム溶液 (1 mL) および 10 mM トリフルオロ酢酸 (0.5 mL) で洗浄を行った。最後に、溶出溶媒として 10 mM トリフルオロ酢酸 (1 mL × 3) で脱離を行い、エバポレータで減圧濃縮した。得られた残渣をア

セトニトリル：精製水（90：10、v/v）混液で再溶解を行い、HILIC/MS の分析に供した。

#### 3.4. ヒト生体試料

本研究遂行にあたり、生体試料採取は提供対象者に対する人権擁護上の配慮、研究に対する利益・不利益等の説明を行い、インフォームドコンセントを得た。また、生体試料の保存は-80℃で行い、分析直前に室温で自然解凍した。ボランティアは、男女合わせて10名であり、年齢は22～24歳の健常人を選んだ。血液、唾液試料の採取は同日に行い、唾液は食事前にアシスト社製サリベット<sup>®</sup>を用いて採取した。

## 参考論文

- 1) Sies H., Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, **82(2)**, 291-295 (1997).
- 2) Margutti P., Matarrese P., Conti F., Colasanti T., Delunardo F., Capozzi A., Garofalo T., Profumo E., Riganò R., Siracusano A., Alessandri C., Salvati B., Valesini G., Malorni W., Sorice M., Ortona E., Autoantibodies to the C-terminal subunit of RLIP76 induce oxidative stress and endothelial cell apoptosis in immune-mediated vascular diseases and atherosclerosis. *Blood*, **111(9)**, 4559-4570 (2008).
- 3) Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, **160(1)**, 1-40 (2006).
- 4) Klaunig J.E., Kamendulis L.M., Hocevar B.A., Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.*, **38(1)**, 96-109 (2010).
- 5) Bonnefont-Rousselot D., Bastard J.P., Jaudon M.C., Delattre J., Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab.*, **26(3)**, 163-176 (2000).
- 6) Hakim F.A., Pflueger A., Role of oxidative stress in diabetic kidney disease. *Med. Sci. Monit.*, **16(2)**, RA37-48 (2010).
- 7) Espey M.G., Miranda K.M., Feelisch M., Fukuto J., Grisham M.B., Vitek M.P., Wink D.A., Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **899**, 209-221 (2000).
- 8) Pitocco D., Zaccardi F., Di Stasio E., Romitelli F., Santini S.A., Zuppi C., Ghirlanda G., Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev. Diabet. Stud.*, **7(1)**, 15-25 (2010).
- 9) Sodum R.S., Fiala E.S., Analysis of peroxynitrite reactions with guanine, xanthine, and adenine nucleosides by high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection: C8-nitration and -oxidation. *Chem. Res. Toxicol.*, **14(4)**, 438-450 (2011).
- 10) Stoyanovsky D.A., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Anand D., Mandavia D.N., Gius D., Ivanova J., Pitt B., Billiar T.R., Kagan V.E., Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein S-nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.*, **127(45)**, 15815-15823 (2005).
- 11) Espinosa O., Jiménez-Almazán J., Chaves F.J., Tormos M.C., Clapes S., Iradi A., Salvador A., Fandos M., Redón J., Sáez G.T., Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hypertension. *Free Radic. Res.*, **41(5)**, 546-554 (2007).

- 12) Pelclová D., Fenclová Z., Kacer P., Kuzma M., Navrátil T., Lebedová J., Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress in exhaled breath condensate in subjects with asbestos exposure. *Ind. Health*, **46**(5), 484-489 (2008).
- 13) Musiek E.S., Yin H., Milne G.L., Morrow J.D., Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids*, **40**(10), 987-994 (2005).
- 14) Patterson A.D., Li H., Eichler G.S., Krausz K.W., Weinstein J.N., Fornace A.J. Jr, Gonzalez F.J., Idle J.R., UPLC-ESI-TOFMS-based metabolomics and gene expression dynamics inspector self-organizing metabolomic maps as tools for understanding the cellular response to ionizing radiation. *Anal. Chem.*, **80**(3), 665-674 (2008).
- 15) Hawkins C.L., Morgan P.E., Davies M.J., Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, **46**(8), 965-988 (2009).
- 16) Yang J., Schmelzer K., Georgi K., Hammock B.D., Quantitative profiling method for oxylipin metabolome by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **81**(19), 8085-8093 (2009).
- 17) Deiana L., Carru C., Pes G., Tadolini B., Spectrophotometric measurement of hydroperoxides at increased sensitivity by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  in the presence of xlenol orange. *Free Radic. Res.*, **31**(3), 237-244 (1999).
- 18) Labieniec M., Gabryelak T., Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  or  $\text{Cu}^{2+}$  ions. *Toxicol. In Vitro*, **21**(1), 146-156 (2007).
- 19) Barr D.P., Martin M.V., Guengerich F.P., Mason R.P., Reaction of cytochrome P450 with cumene hydroperoxide: ESR spin-trapping evidence for the homolytic scission of the peroxide O-O bond by ferric cytochrome P450 1A2. *Chem. Res. Toxicol.*, **9**(1), 318-325 (1996).
- 20) Yue Qian S., Kadiiska M.B., Guo Q., Mason R.P., A novel protocol to identify and quantify all spin trapped free radicals from in vitro/in vivo interaction of  $\text{HO}^\bullet$  and DMSO: LC/ESR, LC/MS, and dual spin trapping combinations. *Free Radic. Biol. Med.*, **38**(1), 125-135 (2005).
- 21) Ishii Y., Ogara A., Okamura T., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H., Development of quantitative analysis of 8-nitroguanine concomitant with 8-hydroxydeoxyguanosine formation by liquid chromatography with mass spectrometry and glyoxal derivatization. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**(5), 1737-1743 (2007).

- 22) Yi D., Ingelse B.A., Duncan M.W., Smythe G.A., Quantification of 3-nitrotyrosine in biological tissues and fluids: generating valid results by eliminating artifactual formation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11(6)**, 578-586 (2000).
- 23) Ishii Y., Iijima M., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H., Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunohistochemical analysis in livers of mice administered acetaminophen. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41(4)**, 1325-1331 (2006).
- 24) Kato Y., Dozaki N., Nakamura T., Kitamoto N., Yoshida A., Naito M., Kitamura M., Osawa T., Quantification of modified tyrosines in healthy and diabetic human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **44(1)**, 67-78 (2009).
- 25) Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246(4926)**, 64-71 (1989).
- 26) Pitt J.J., Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.*, **30(1)**, 19-34 (2009).
- 27) Fu I., Woolf E.J., Matuszewski B.K., Effect of the sample matrix on the determination of indinavir in human urine by HPLC with turbo ion spray tandem mass spectrometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18(3)**, 347-357 (1998).
- 28) Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal. Chem.*, **70(5)**, 882-889 (1998).
- 29) Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.*, **75(13)**, 3019-3030 (2003).
- 30) Toyooka T., Suzuki T., Saito Y., Uzu S., Imai K., Fluorogenic reagent for thiols: 4-(*N,N*-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole. *Analyst*, **114(4)**, 413-419 (1989).
- 31) Aoyama C., Santa T., Tsunoda M., Fukushima T., Kitada C., Imai K., A fully automated amino acid analyzer using NBD-F as a fluorescent derivatization reagent. *Biomed. Chromatogr.*, **18(9)**, 630-636 (2004).
- 32) Korös A., Varga Z., Molnár-Perl I., Simultaneous analysis of amino acids and amines as their

- o*-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1203**(2), 146-152 (2008).
- 33) 岩崎雄介, 伊東 岳, 北村 渉, 加藤美穂子, 小平 司, 堀江正一, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之, 酵素免疫測定法及び高速液体クロマトグラフィーによる食肉中キノロン系抗菌剤の分析. *分析化学*, **55**(12), 943-948 (2006).
- 34) Fonteh A.N., Harrington R.J., Harrington M.G., Quantification of free amino acids and dipeptides using isotope dilution liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Amino Acids*, **32**(2), 203-212 (2007).
- 35) FDA Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001.
- 36) Michelet F., Gueguen R., Leroy P., Wellman M., Nicolas A., Siest G., Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: relation to sex, aging, biological variables, and life habits. *Clin. Chem.*, **41**(10), 1509-1517 (1995).
- 37) Richie J.P. Jr, Skowronski L., Abraham P., Leutzinger Y., Blood glutathione concentrations in a large-scale human study. *Clin. Chem.*, **42**(1), 64-70 (1996).
- 38) Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F., Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta*, **333**(1), 19-39 (2003).
- 39) Iwasaki Y., Saito Y., Nakano Y., Mochizuki K., Sakata O., Ito R., Saito K., Nakazawa H., Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **877**(28), 3309-3317 (2009).
- 40) Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I., Giustarini D., Lusini L., Colombo R., Di Simplicio P., Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin. Chem.*, **48**(5), 742-753 (2002).
- 41) Guan X., Hoffman B., Dwivedi C., Matthees D.P., A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**(2), 251-261 (2003).
- 42) Garcia S.C., Schott K., Charão M., Moro A., Bulcão R., Grotto D., Valentini J., Bohrer D., Cardoso S., Pomblum V., Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes of hemodialysis patients. *Biomed. Chromatogr.*, **22**(5), 460-468 (2008).

- 43) McMenamin M.E., Himmelfarb J., Nolin T.D., Simultaneous analysis of multiple aminothiols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **877(28)**, 3274-3281 (2009).
- 44) Kurihara T., Min J.Z., Toyo'oka T., Fukushima T., Inagaki S., Determination of fluorescence-labeled asparaginyoligosaccharide in glycoprotein by reversed-phase ultraperformance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **79(22)**, 8694-8698 (2007).
- 45) Xu L., Spink D.C., Analysis of steroidal estrogens as pyridine-3-sulfonyl derivatives by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **375(1)**, 105-114 (2008).
- 46) Lord H.L., Rosenfeld J., Volovich V., Kumbhare D., Parkinson B., Determination of malondialdehyde in human plasma by fully automated solid phase analytical derivatization. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **877(13)**, 1292-1298 (2009).
- 47) Gao S., Zhang ZP, Karnes HT., Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **825(2)**, 98-110 (2005).
- 48) Iwasaki Y., Nakano Y., Mochizuki K., Nomoto M., Takahashi Y., Ito R., Saito K., Nakazawa H., A new strategy for ionization enhancement by derivatization for mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **879(17-18)**, 1159-1165 (2011).
- 49) Alpert A.J., Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.*, **499**, 177-196 (1990).
- 50) 岩崎雄介, 井之上浩一, 伊藤里恵, 吉村吉博, 斉藤貢一, 中澤裕之, 親水性相互作用液体クロマトグラフィー/質量分析法によるヒト生体試料中アラントインの定量. *分析化学*, **54(2)**, 135-142 (2005).
- 51) Iwasaki Y., Ishii Y., Ito R., Saito K., Nakazawa H., New approaches for analysis of metabolism compounds in hydrophilic interaction chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **30(14)**, 2117-2126 (2007).
- 52) Iwasaki Y., Goto M., Mochizuki K., Terayama E., Ito R., Saito K., Sugino N., Makino T., Nakazawa H., Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry for quantification of nicotine and its metabolites in human maternal



- and cord sera. *Biomed. Chromatogr.*, **25(4)**, 503-510 (2011).
- 53) Mano N., Nozawa M., Sato M., Mori M., Yamaguchi H., Kanda K., Nogami M., Goto J., Shimada M., Identification and elimination of ion suppression in the quantitative analysis of sirolimus in human blood by LC/ESI-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **879(13-14)**, 968-974 (2011).
  - 54) Nishikawa M., Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett.*, **266(1)**, 53-59 (2008).
  - 55) Martínez M.C., Andriantsitohaina R., Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, **11(3)**, 669-702 (2009).
  - 56) Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis K., Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, **6(2)**, 445-462 (2009).
  - 57) Wölflé U., Esser P.R., Simon-Haarhaus B., Martin S.F., Lademann J., Schempp C.M., UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.*, **50(9)**, 1081-1093 (2011).
  - 58) Bjelakovic G., Nikolova D., Gluud L.L., Simonetti R.G., Gluud C., Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, **297(8)**, 842-857 (2007).
  - 59) Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomás-Barberán F.A., Datta N., Singanusong R., Chen S.S., Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **59(3)**, 113-122 (2004).
  - 60) Perron N.R., Brumaghim J.L., A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.*, **53(2)**, 75-100 (2009).
  - 61) National Center for Health Statistics. Analytic and reporting guidelines: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES-III (1988-94). Hyattsville (MD): CDC; 1996.
  - 62) Zheng L.F., Wei Q.Y., Cai Y.J., Fang J.G., Zhou B., Yang L., Liu Z.L., DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: mechanism and structure-activity relationship. *Free Radic. Biol. Med.*, **41(12)**, 1807-1816 (2006).

- 63) Zheng L.F., Dai F., Zhou B., Yang L., Liu Z.L., Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: mechanism and structure-activity relationship. *Food Chem. Toxicol.*, **46(1)**, 149-156 (2008).
- 64) Wang T., Chen L.X., Long Y., Wu W.M., Wang R., DNA damage induced by caffeic acid phenyl ester in the presence of Cu(II) ions: potential mechanism of its anticancer properties. *Cancer Lett.*, **263(1)**, 77-88 (2008).
- 65) Yamaguchi F., Saito M., Ariga T., Yoshimura Y., Nakazawa H., Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J. Agric. Food Chem.*, **48(6)**, 2320-2325 (2000).
- 66) Szydlowska-Czerniak A., Trokowski K., Karlovits G., Szlyk E., Determination of antioxidant capacity, phenolic acids, and fatty acid composition of rapeseed varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **58(13)**, 7502-7509 (2010).
- 67) Ishii Y., Umemura T., Kanki K., Kuroiwa Y., Nishikawa A., Ito R., Saito K., Nakazawa H., Hirose M., Possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **447(2)**, 127-135 (2006).
- 68) Ferioli R., Folco G.C., Ferretti C., Gasco A.M., Medana C., Fruttero R., Civelli M., Gasco A., A new class of furoxan derivatives as NO donors: mechanism of action and biological activity. *Br. J. Pharmacol.*, **114(4)**, 816-820 (1995).
- 69) Tsikas D., Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **851(1-2)**, 51-70 (2007).
- 70) Goldstein S., Czapski G., Lind J., Merényi G., Effect of  $\cdot\text{NO}$  on the decomposition of peroxyxynitrite: reaction of  $\text{N}_2\text{O}_3$  with  $\text{ONOO}^\cdot$ . *Chem. Res. Toxicol.*, **12(2)**, 132-136 (1999).
- 71) Galli U., Lazzarato L., Bertinaria M., Sorba G., Gasco A., Parapini S., Taramelli D., Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. *Eur. J. Med. Chem.*, **40(12)**, 1335-1340 (2005).
- 72) Sorba G., Galli U., Cena C., Fruttero R., Gasco A., Morini G., Adami M., Coruzzi G., Brenciaglia M.I., Dubini F., A new furoxan NO-donor rabeprazole derivative and related compounds. *Chembiochem*, **4(9)**, 899-903 (2003).

- 73) Zou X.Q., Peng S.M., Hu C.P., Tan L.F., Deng H.W., Li Y.J., Furoxan nitric oxide donor coupled chrysin derivatives: synthesis and vasculoprotection. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21(4)**, 1222-1226 (2011).
- 74) Inoue K., Namiki T., Iwasaki Y., Yoshimura Y., Nakazawa H., Determination of uric acid in human saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **785(1)**, 57-63 (2003).
- 75) Zhang L., Xiao H., Wong D.T., Salivary biomarkers for clinical applications. *Mol. Diagn. Ther.*, **13(4)**, 245-259 (2009).
- 76) De Palo E.F., Antonelli G., Benetazzo A., Prearo M., Gatti R., Human saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse phase HPLC technique. *Clin. Chim. Acta*, **405(1-2)**, 60-65 (2009).
- 77) Navarro J., Obrador E., Carretero J., Petschen I., Aviñó J., Perez P., Estrela J.M., Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, **26(3-4)**, 410-418 (1999).
- 78) Kharb S., Low whole blood glutathione levels in pregnancies complicated by preeclampsia and diabetes. *Clin. Chim. Acta*, **294(1-2)**, 179-183 (2000).
- 79) Cotellet P., Vezin H., Reaction of caffeic acid derivatives with acidic nitrite. *Tetrahedron Lett.*, **42(19)**, 3303-3305 (2001).
- 80) Napolitano A., d'Ischia M., New insights into the acid-promoted reaction of caffeic acid and its esters with nitrite: decarboxylation drives chain nitrosation pathways toward novel oxime derivatives and oxidation/fragmentation products thereof. *J. Org. Chem.*, **67(3)**, 803-810 (2002).